

AVALIAÇÃO DO TEMPO DE VIDA ÚTIL DO LEITÃO ASSADO DE NEGRAIS

Cristiana Filipa Pedroso Marta

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar – Processamento de Alimentos

Orientador: Doutor Manuel José Pimenta Malfeito Ferreira

Júri:

Presidente: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Manuel José Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Maria Adélia Silva Santos Ferreira, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

2014

“O importante é não parar de questionar.
A curiosidade tem sua própria razão de existir.”

- Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Quero dedicar o espaço desta secção de agradecimentos a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, tiveram um papel importante na concretização dos meus objetivos e na realização desta dissertação.

Ao Professor Doutor Manuel Malfeito Ferreira agradeço a orientação, o apoio incondicional, a constante disponibilidade, a sabedoria, simpatia, boa disposição e os ensinamentos constantes que tornaram possível a elaboração desta dissertação, no que diz respeito à sua parte teórica e, essencialmente, à parte prática e científica.

À Engenheira Ana Carla Silva agradeço toda a ajuda prestada, a disponibilidade, persistência e constante partilha de conhecimentos sobre o aspeto prático desta dissertação e análises laboratoriais.

Tenho a agradecer a todos os que colaboram com o laboratório de microbiologia pela constante disponibilidade, prontidão e eficiência e aos colegas com quem partilhei longos dias de ensaios laboratoriais.

Aos meus colegas e amigos que me acompanharam em todo este percurso, estando sempre dispostos a fornecer algum apoio e auxílio necessário, compreendendo sempre as minhas ausências.

À Micaela Carvalho Gomes, o meu profundo agradecimento por todo o apoio incondicional, pela confiança em mim depositada, pela força que me foi transmitida constantemente, pelo carinho e compreensão demonstrados e pela partilha diária de momentos que me fizeram crescer, principalmente, a nível pessoal.

Aos meus pais, que tornaram possível a concretização de mais uma etapa, mostrando que valorizam o saber científico, a pesquisa e o conhecimento, tendo fornecido a base para a concretização deste projeto.

Aos meus irmãos, que se mostraram disponíveis para a partilha de conhecimentos que foram importantes para o desenvolvimento da dissertação.

Aos meus avós, que partilharam comigo a sua sabedoria e vastos conhecimentos sobre a tradição e a história do comércio de leitão assado, mostrando-se sempre disponíveis para o esclarecimento de qualquer dúvida.

RESUMO

O leitão assado de Negrais é um produto tradicional português, com fortes ligações regionais e bastante apreciado pelos consumidores. O objetivo desta dissertação foi determinar o tempo de vida útil deste produto avaliando a sua carga microbiana, as suas características sensoriais e a sua aptidão como substrato de crescimento de microrganismos patogénicos.

As amostras foram armazenadas entre 8 e 10 °C durante 16 dias, sendo determinados os mesófilos aeróbios totais e realizado um *challenge test*, inoculando *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus*.

As contagens dos mesófilos aeróbios totais permaneceram sempre abaixo de 3×10^5 ufc/g, valor considerado como limite máximo de contaminação. Os resultados obtidos com o *challenge test* permitiram verificar que os microrganismos inoculados não tiveram crescimento ao longo do tempo de incubação. O fator determinante no estabelecimento da vida útil foi a qualidade sensorial que começou a sofrer alterações a partir do 3º dia de refrigeração, considerando-se o produto inaceitável a partir do 6º dia de armazenagem.

Os resultados obtidos permitiram concluir que o leitão assado é um produto microbiologicamente seguro e que mantém a sua qualidade sensorial quando conservado a temperaturas de refrigeração durante 2 a 3 dias.

Palavras-chave: leitão assado; qualidade; conservação; vida útil; microrganismos; *challenge test*.

ABSTRACT

Negrais roasted piglet is a traditional Portuguese product, with a strong regional background and very appreciated by its consumers. The aim of this work was to determine the shelf life of this product by evaluating its microbiota, its sensory characteristics and the suitability as a substrate for the growth of pathogenic microorganisms.

The samples were stored between 8 and 10 °C for 16 days in order to determine the total mesophilic aerobic microorganisms. A challenge test was also accomplished by inoculating *Escherichia coli*, *Listeria*, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*.

The counts of total mesophilic aerobic microorganisms remained always below 3×10^5 cfu/g, which is considered the maximum limit of contamination. The results of the challenge test permitted to verify that the microorganisms inoculated haven't grown over the time of incubation. The determining factor in establishing the shelf life was the sensory quality that began to change from the 3rd day, at chilling temperatures, becoming an unacceptable product from the 6th day of storage.

The results showed that the roasted piglet is a microbiologically safe product that retains its sensory quality when stored at refrigeration temperatures for 2-3 days.

Key words: roasted piglet; quality; conservation; shelf life; microorganisms; challenge test.

EXTENDED ABSTRACT

The Portuguese cuisine is a reflection of the country historical and cultural diversity, based on typical traditional products of the various regions. These products have survived through time, preserving the characteristics that define the appearance, texture and flavor (Bernat, 1996).

Roasted piglet is a meat product, properly processed by heat and is ready-to-eat. Water and salt are the only ingredients that are used in its preparation. It is consumed preferably luke warm or at room temperature, right after it has been roasted. The most commonly used local breed of swine is Bísaro which is especially suitable for this type of food product due to its higher proportion of muscle in comparison to fat. Fat is mainly located in the intramuscular spaces, which gives a tender and characteristic flavor (ANCSUB, 2007).

Piglets have a lower fat content, protein and minerals than adults, being less prone to accumulation of intermuscular and subcutaneous fat, giving them different technological and sensory characteristics (Magnoni and Pimentel, 2005).

The quality definition of swine meat is quite complex because there are a number of intrinsic factors related to the animal, and extrinsic, related to all stages of the processing chain, which influence the different quality characteristics. Some of these characteristics are the weight of the carcass, meat color, water retention capacity and sensory and nutritional value (Bridi e Silva, 2012).

The agents of change or deterioration of meat, in particular, may be physical-chemical origin, such as lipid and protein oxidation, microbiological or denaturation. These agents may result in decreased sensory quality such as loss of flavor and texture, and reductions in nutritional value, thus reducing the commercial value (Ribeiro, 1997).

The foods we eat are rarely sterile. They have a microbial load whose composition depends on how microorganisms develop, survive and interact with food. These microorganisms are part of the natural microbiota and various food processes like cutting / harvest, storage and distribution. The balance between the various strains will depend on the properties of the food storage environment, characteristics of the microorganisms and the effects of processing (Adams and Moss, 2008).

In order to prevent that presence of microorganisms becomes a source of disease for the consumer, it is necessary to destroy them or manipulate the food so that their growth is prevented, being necessary to use different control measures (Adams and Moss, 2008).

In the microbiota of meat, the mesophilic microorganisms are of major importance. With optimal temperature at 37 °C, they are of human or animal origin and contain many of the common pathogens such as *Salmonella*, and *Staphylococcus aureus*. Mesophilic bacteria have low growth rates at refrigeration temperatures, so, at those temperatures, the deterioration of food is lower (Adams and Moss, 2008).

One way to evaluate the safety and quality of food, which is related to the microbial load of the food, is the determination of shelf life or expiration date to which the food product is safe and maintains its desired characteristics (IFST, 1993).

The definition of shelf-life, according to the guidelines of the IFST (1993), is the time during which the food product will remain safe, keep their sensory, chemical, physical and microbiological characteristics and will comply with all statements contained in the label when stored under recommended conditions.

In short product shelf life, as the case of piglets, microbiological changes are conservation problems of primary importance, followed by the chemical and sensory changes (FIB, 2011).

The shelf-life can be determined by storing the product under appropriate conditions and monitor by means of measurements, the behavior of the microbiota in certain time intervals (Kilcast and Subramaniam, 2000).

A challenge test can be applied for determining and studying the growth of specific microorganisms, such as pathogens, which may contaminate the food due to lack of hygiene in production and handling. In this case, the selected microorganisms are inoculated and their development is monitored (Kilcast and Subramaniam, 2000).

Within this dissertation several microbiological tests were made in order to study the microbiota in the food product after processing, the evolution of microbiota during the shelf-life and the behavior of some pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, and *Staphylococcus aureus*) in processed meat.

In addition to the above mentioned tests, sensory tests were performed in food, especially which regard to the visual appearance, in order to draw conclusions about the acceptance of the product by the consumer within the shelf-life.

To determine the shelf-life of the roasted piglet, total mesophilic aerobic microbiota present was analyzed in the product in order to obtain a graphical representation of ufc/g versus time, taking into account the legislated values of contamination regarding meat products.

Characteristics such as color, oozing of water and presence of visible fungi were evaluated.

In the 5-day period of shelf life the product quality is guaranteed, and the values of microbial contamination are within the maximum limit with respect to the total mesophile count, which is 3×10^5 CFU/g (Florêncio e Marta, 2005).

The data proves that the piglet, while kept between 8 and 10 °C, does not promote the growth of the pathogenic microorganisms analyzed.

The presence of visible mold was observed, this being an important factor, since molds are responsible for undesirable flavors in foods, leading to rejection of the product by the consumer.

From the analysis, it was concluded that the piglet is a regional product which is carefully prepared, with an effective quality control system, which ensures the health and safety of the product by the end of three to five days of shelf-life.

ÍNDICE

Índice de Quadros	ix
Índice de Figuras	x
Lista de Abreviaturas	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Introdução geral	1
1.2 Leitão assado de Negrais	1
1.2.1 História e tradição	1
1.2.2 Caracterização do produto	3
1.2.3 Descrição do processo	7
1.3 A carne na dieta humana	11
1.4 Características de qualidade da carne suína	13
1.5 Microbiota presente na carne	15
1.5.1 <i>Escherichia coli</i>	19
1.5.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	20
1.5.3 <i>Salmonella</i>	21
1.5.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	22
1.6 Alterações da carne durante o processamento térmico	23
1.7 Conservação da carne	24
1.7.1 Refrigeração	27
1.7.2 Congelação	28
1.8 Avaliação do tempo de vida útil	29
2. ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Colheita de amostras	35
3.2 Preparação das amostras	36
3.3 Determinação do tempo de vida útil	38
3.4 <i>Challenge test</i>	40
3.4.1 Preparação do inóculo	40
3.4.2 Preparação das amostras	41
3.4.3 <i>Escherichia coli</i>	42
3.4.4 <i>Listeria innocua</i>	42

3.4.5 <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	43
3.4.6 <i>Staphylococcus aureus</i>	44
3.5 Avaliação sensorial	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Determinação de mesófilos aeróbios totais ao longo do tempo	46
4.2 <i>Challenge test</i>	48
4.3 Avaliação sensorial	50
5. CONCLUSÕES	52
5.1 Considerações finais e trabalhos futuros	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
6.1 Bibliografia	54
6.2 Cibergrafia.....	57
ANEXOS	I
Anexo I – Determinação de mesófilos aeróbios totais ao longo do tempo	II
Anexo II – <i>Challenge test</i>	III

Índice de Quadros

Quadro 1 – Composição nutricional do leitão assado	7
Quadro 2 – Composição nutricional da carne	12
Quadro 3 – Classificação de microrganismos segundo as suas temperaturas específicas.....	17
Quadro 4 – Actividade da água de alimentos.....	18
Quadro 5 – Classificação de <i>Escherichia coli</i>	20
Quadro 6 – Resumo das características dos microrganismos patogénicos.....	23
Quadro 7 - Condições mínimas de crescimento para microrganismos seleccionados	25
Quadro 8 – Limites microbiológicos em leitão assado.....	26
Quadro 9 – Tempo de vida útil de alimentos refrigerados	28
Quadro 10 – Efeito da congelação no a_w de água pura.....	29
Quadro 11 – Alterações nos alimentos	31
Quadro 12 – Tipos de instrumentos utilizados para avaliar a <i>shelf-life</i>	32
Quadro 13 – Calendarização das análises microbiológicas	36
Quadro 14 – Calendarização da avaliação sensorial	45
Quadro 15 – Contagens microbianas no início e fim do tempo de validade	47

Índice de Figuras

Figura 1 – António Pedroso.	2
Figura 2 – Venda de leitão em cestos de vime em 1906.	3
Figura 3 – Assadura em forno a lenha por António Rosa Pedroso, neto de António Pedroso, em 1968.	3
Figura 4 – Distribuição das explorações de porco bísaro em Portugal (adaptado de ANCSUB, 2007).	4
Figura 5 – Raça bísara (adaptado de Freire, 2012).	5
Figura 6 – Processo de abate de leitões (adaptado de Florêncio e Marta, 2005)	6
Figura 7 – Diagrama de produção.	8
Figura 8 – Leitões em câmara de refrigeração.	9
Figura 9 – Aquecimento do forno.	10
Figura 10 – Viragem das carcaças.	10
Figura 11 – Leitão após arrefecimento.	11
Figura 12 – Embalagem.	11
Figura 13 – Curva de crescimento microbiano.	16
Figura 14 – Efeito da temperatura na taxa de crescimento microbiana (adaptado de Adams e Moss, 2008)	17
Figura 15 – Valores de pH de alimentos (adaptado de Adams e Moss, 2008)	18
Figura 16 – <i>Staphylococcus aureus</i> (adaptado de Adams e Moss, 2008)	22
Figura 17 – Métodos de conservação dos alimentos (adaptado de Ribeiro, 1997)	27
Figura 18 – Data de validade num rótulo de um produto alimentar (adaptado de FIB, 2011)	30
Figura 19 – Zonas da carcaça utilizadas para amostragem.	35
Figura 20 – Amostras de leitão embaladas.	36
Figura 21 – <i>Stomacher</i> e suspensão-mãe.	37
Figura 22 – Diluições realizadas nas amostras.	38
Figura 23 – Determinação de mesófilos totais.	39
Figura 24 – Mesófilos aeróbios totais em <i>Plate Count Agar</i>	39
Figura 25 – Preparação dos inóculos.	41
Figura 26 – <i>Escherichia coli</i> em <i>Tryptone Bile X-Glucuronide</i>	42
Figura 27 – <i>Listeria</i> em <i>Palcam Agar Base</i> (adaptado de Biokar, s.d.)	43
Figura 28 – <i>Salmonella</i> em <i>Xylose-Lisine-Desoxycholate Agar</i> (adaptado de EoLabs, 2013)	43
Figura 29 – <i>Staphylococcus aureus</i> em <i>Baird-Parker Agar</i> (adaptado de PVL, 2012)	44
Figura 30 – Evolução das contagens de mesófilos totais durante o tempo de vida útil (◆ Cachaço; ■ Lombo; △ Perna)	46
Figura 31 – <i>Challenge test</i> de <i>Escherichia coli</i> (A), <i>Listeria innocua</i> (B), <i>Salmonella Typhimurium</i> (C) e <i>Staphylococcus aureus</i> (D) após inoculação em leitão assado.	49
Figura 32 – Avaliação sensorial de uma amostra de leitão assado após a assadura (A), depois de 3 dias (B) e após 6 dias em refrigeração (C)	50

Lista de Abreviaturas

ANCSUB – Associação Nacional de Criadores de Suínos de Raça Bísara

BP – Baird-Parker

CE – Comissão Europeia

DFD – *Dark, Firm and Dry*

EIEC – *Escherichia coli* Enteroinvasiva

EHEC – *Escherichia coli* Enterohemorrágica

EPEC – *Escherichia coli* Enteropatogénica

ETEC – *Escherichia coli* Enterotoxigénica

FIB – Food Ingredients Brasil

IFST – Institute of Food Science & Technology

HACCP – *Hazard Analysis and Critical Control Points*

ISO – *International Organization of Standardization*

NP – Norma Portuguesa

PAB – *Palcam Agar Base*

PCA – *Plate Count Agar*

PSE – *Pale, Soft and Exudative*

RES – *Red, Exudative and Soft*

RFN – *Red, Firm and Non-exudative*

S.d. – Sem data

TBX - *Tryptone Bile X-Glucuronide*

TSB - *Tryptone Soya Broth*

UFC – Unidades formadoras de colónias

XLD – *Xylose-Lisine-Desoxycholate Agar*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Introdução geral

A gastronomia portuguesa, rica em qualidade e sabor, é um reflexo da diversidade histórica e cultural do país, tendo por base produtos tradicionais típicos das diversas regiões.

O conceito de produto tradicional é de difícil definição. São produtos obtidos a partir de processos que não foram alterados pela inovação tecnológica (Tibério, 1998), únicos pelas matérias-primas utilizadas e identificáveis pela sua origem geográfica (Barberis, 1992; Ribeiro e Martins, 1996). Estes produtos persistem no tempo, conservando as características que os definem no que diz respeito ao aspeto, textura e sabor (Bernat, 1996). Em Portugal existem inúmeros produtos alimentares tradicionais, tais como o queijo Serra da Estrela, o ananás dos Açores e a carne de porco alentejano.

As exigências crescentes do mercado envolvem produtos alimentares seguros, de preparação rápida, com qualidade sensorial e nutricional, sendo esta, no geral, definida pelo consumidor segundo as suas preferências pessoais e objetivos (Becker, 2002). Sendo assim, a qualidade e segurança dos alimentos é um aspeto fundamental no que diz respeito à aceitação do produto e à saúde do consumidor, devendo ser assegurada nos produtos tradicionais. Para isto, é necessária a realização de estudos para avaliar variados parâmetros a nível industrial, laboratorial e sensorial. Um desses estudos, relacionados com a carga microbiana do alimento, é a determinação da *shelf-life* ou data de validade, ou seja, o tempo em que o produto alimentar é seguro e mantém as suas características desejadas (IFST, 1993).

Nesta dissertação será divulgado um dos produtos regionais portugueses, o leitão assado de Negrais, recorrendo à sua história, processamento e características, referindo a importância da carne na dieta humana e a necessidade de a preservar, mantendo as suas características de qualidade durante a *shelf-life*.

1.2 Leitão assado de Negrais

1.2.1 História e tradição

A tradição de assar leitão em Negrais, uma localidade do concelho de Sintra, distrito de Lisboa, remonta ao final do século XIX. Na altura, algumas das festas mais importantes na região saloia eram os casamentos e os seus banquetes. Estes incluíam, entre outros pratos, canja de galinha, borrego e leitão assados em forno de

lenha e arroz doce. O leitão era das melhores iguarias consumidas nessas ocasiões, nunca tendo sido comercializado até à data.

Em Almoçageme, uma aldeia da freguesia de Colares, existia uma das quintas nas quais esses grandes banquetes se realizavam. Era aí que trabalhava António Pedroso, residente em Negrais, que, ao ver o sucesso daquele produto regional, acabou por deixar o seu emprego para apostar neste novo tipo de negócio, trazendo-o para a sua zona de residência, estando representado na figura 1.



Figura 1 – António Pedroso.

Com as vendas a serem realizadas principalmente nas feiras do concelho, o número de clientes foi sempre aumentando, o que levou a que surgissem mais nomes de assadores de leitão, como Luís Silvestre, Sabino e Luís Feliciano, contribuindo para a expansão do negócio e para enraizar o leitão nas suas origens regionais. Nesta altura as balanças ainda não eram utilizadas e o preço dependia não só da quantidade comprada, mas também da capacidade de regatear do cliente.

Após alguns anos, o produto começou a ser transportado até Lisboa, utilizando a linha ferroviária do Oeste, sendo acondicionado em cestos de vime e tecido branco de algodão, como demonstra a figura 2, de forma a ser distribuído em diversos restaurantes e cervejarias.



Figura 2 – Venda de leitão em cestos de vime em 1906.

O método de assadura tradicional em forno a lenha, similar ao da figura 3, foi transmitido continuamente de pais para filhos, tendo as instalações e os materiais utilizados evoluído de forma a corresponder à crescente procura.

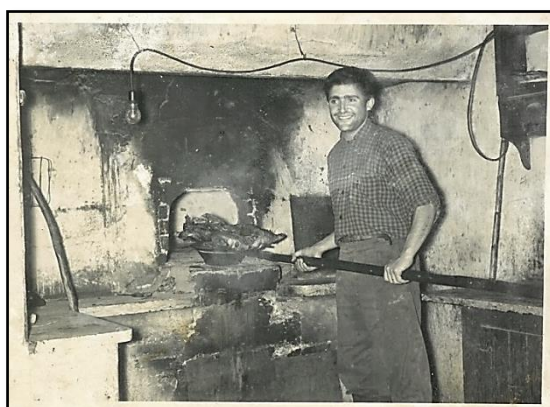


Figura 3 – Assadura em forno a lenha por António Rosa Pedroso, neto de António Pedroso, em 1968.

Hoje, cerca de 120 anos depois de António Pedroso fundar o seu negócio familiar, este ainda existe, sendo atualmente gerido pela sua bisneta Florbela Pedroso Marta, mantendo o processo e ingredientes fiéis à receita original, sendo as amostras recolhidas neste estudo provenientes desta pequena indústria. O leitão continua a ser vendido em feiras, restaurantes e supermercados no concelho de Sintra e arredores e, também, por *take-away* ou entregas na zona da Grande Lisboa.

1.2.2 Caracterização do produto

Sendo o leitão um produto tradicional português, a raça de suíno autóctone maioritariamente utilizada é a bísara podendo, em menor escala, ser utilizadas outras raças, como a *Duroc* e *Land Race*. Estas raças menos utilizadas são de leitões de maior porte, indicados para a venda de leitão por peças em vez de carcaças inteiras.

A raça bísara é especialmente indicada para este tipo de produto alimentar devido à sua proporção de músculo maior do que de gordura, estando esta maioritariamente localizada nos espaços intramusculares, obtendo-se uma carne tenra e de sabor característico. As explorações de porco bísaro situam-se em maior número na região Transmontana, existindo também no Minho, Douro e Beira Litoral, como representa a figura 4. Em 2007, o número de efetivo reprodutor era de cerca de 1286 fêmeas e 200 machos, estando distribuídos por 93 explorações, encontrando-se a maioria destas no concelho de Vinhais (ANCSUB, 2007).



Figura 4 – Distribuição das explorações de porco bísaro em Portugal (adaptado de ANCSUB, 2007).

Os caracteres morfológicos destes animais são a sua cor branca, malhada de escuro, com um dorso comprido e estreito, curvatura convexa e pouco musculado, como demonstra a figura 5 (Freire, 2012).



Figura 5 – Raça bísara (adaptado de Freire, 2012).

A idade de abate dos leitões é, no máximo, aos 45 dias após o nascimento, com peso inferior a 12 quilogramas e, de preferência, logo após desmame, sem serem introduzidos outros tipos de alimentação (Freire, 2012). O abate é realizado em matadouros autorizados, seguindo as etapas da figura 6.

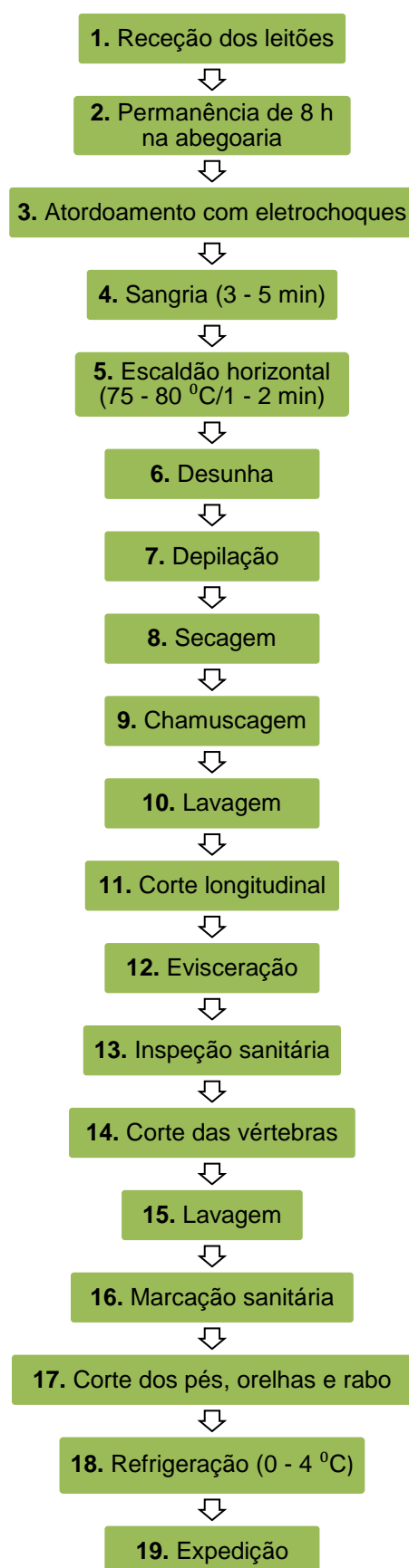


Figura 6 – Processo de abate de leitões (adaptado de Florêncio e Marta, 2005)

Uma das particularidades do sistema de abate é o corte longitudinal das vértebras, para que o leitão permaneça aberto e espalmado. Esta é a principal característica que distingue o leitão de Negrais do da Bairrada, dado que o último tem por objetivo a assadura do leitão fechado. A matéria-prima são, assim, leitões crus e refrigerados a uma temperatura de 0 a 4 °C, com um peso médio de 10 quilogramas.

O leitão assado é um produto cárneo, processado adequadamente pelo calor e ready-to-eat, sendo água e sal os únicos ingredientes utilizados no seu processamento.

O Quadro 1 resume as características nutricionais do produto.

Quadro 1 – Composição nutricional do leitão assado

Composição Nutricional/100 g		Fonte
Água	61,2	Florêncio e Marta, 2005
Proteína	21,9	
Gordura	14,9	

É consumido preferivelmente morno ou à temperatura ambiente, logo após assadura. Pode ser refrigerado ou congelado e aquecido posteriormente no forno a 200 °C/5 min, ou no micro-ondas, na função *grill*, durante 2 min. Poderá ser acompanhado por um molho típico cuja preparação se mantém no segredo da receita original, composto principalmente por alho, sal, azeite e pimenta.

É um produto direcionado para o consumidor em geral, incluindo grupos de risco, como crianças, grávidas e idosos.

1.2.3 Descrição do processo

As etapas do processamento de leitão assado estão enumeradas na figura 7, assim como os materiais necessários ao fabrico.

Na recepção, são recebidos os leitões crus e refrigerados do fornecedor, de forma a não ser quebrada a cadeia de frio. As carcaças possuem uma marca sanitária e estão identificadas segundo o seu número de lote, o que permite um rastreamento ao longo da cadeia de transporte.

8



Figura 8 – Leitões em câmara de refrigeração

De forma a permitir uma circulação de ar satisfatória entre as carcaças, estas deverão ser dispostas na câmara com uma distância mínima de 10 centímetros e não devem estar em contacto com o pavimento ou as paredes. A refrigeração das carcaças retarda a multiplicação das bactérias psicotróficas e inibe a presença de microrganismos mesófilos (Gil, 2000).

Ao serem retiradas das câmaras de refrigeração, as carcaças são salgadas com sal grosso. Este é o único tempero adicionado ao leitão, sendo as carcaças picadas, para que o sal penetre na carne, ficando em repouso durante 12 horas. Após as 12 horas de salga, ocorre uma lavagem que permite retirar o excesso de sal e preparar as carcaças para a assadura.

Para o aquecimento do forno, processo ilustrado na figura 9, é utilizada madeira não-resinosa, de forma a não existir transferência de compostos desagradáveis para o produto.



Figura 9 – Aquecimento do forno

A temperatura ideal ronda os 400 °C, sendo atingida após 30 minutos de aquecimento. As carcaças são colocadas nas grelhas com a zona ventral virada para baixo, sendo dessa forma que são assadas nesta 1ª fase. Para além da assadura da carne, pretende-se principalmente que a pele adquira uma textura estaladiça e cor dourada.

Após 30 minutos, as grelhas são retiradas do forno com o objetivo de virar as carcaças, para que a zona ventral passe a estar virada para cima. Este processo está representado na figura 10.



Figura 10 – Viragem das carcaças

A 2ª e última fase da assadura realiza-se durante 1 hora e 30 minutos, o que significa que as carcaças permanecem cerca de 2 horas dentro dos fornos, no total. Após a assadura, as carcaças são picadas, recorrendo a uma faca, para que a gordura fundida escorra para os tabuleiros colocados na parte inferior da grelha.

O arrefecimento ocorre, preferencialmente, nas grelhas de assadura, pois, enquanto quentes, as carcaças são muito quebradiças. Até atingir a temperatura

ambiente, são necessárias cerca de duas horas, sendo o produto final retratado pela figura 11.



Figura 11 – Leitão após arrefecimento

O acondicionamento e embalagem são realizados em caixas de cartão canelado, como as representadas na figura 12, e papel vegetal próprio para estar em contacto com alimentos.



Figura 12 – Embalagem

O rótulo da caixa deverá indicar os ingredientes, o lote, as condições de conservação, a data de embalagem e de validade do produto.

A expedição pode ser a venda direta ao consumidor final, ou o transporte até um local onde haja exposição em arcas refrigeradas. O veículo de transporte e as arcas deverão estar ambos a uma temperatura refrigerada de 4 °C.

1.3 A carne na dieta humana

Sendo o leitão um produto cárneo torna-se relevante definir e caracterizar a carne, no geral, por ser um componente essencial na dieta humana, há pelo menos 2 milhões de anos. A genética e as características físicas humanas têm sido adaptadas ao consumo deste alimento, como por exemplo, os dentes e a estrutura do maxilar, desenvolvidos para a mastigação e deglutição (Higgs, 2002).

A carne tem como definição: “Os músculos esqueléticos (incluindo o diafragma e os masséteres, excluindo o coração, a língua e os músculos da cabeça, do carpo, do tarso e da cauda), das espécies mamíferas e de aves, que são reconhecidos como próprias para consumo humano com os tecidos que estão naturalmente incluídos ou aderentes, em relação aos quais os teores totais em matéria gorda e tecido conjuntivo não excedem os valores tabelados e sempre que a carne constitua um ingrediente do outro género alimentício.” (Matos, 2013, p.6).

Como demonstra o Quadro 2, a carne é um alimento densamente nutricional, composto por proteínas, ácidos gordos, vitaminas do complexo B e minerais como ferro, fósforo e potássio (Higgs, 2002).

Quadro 2 – Composição nutricional da carne

Composição nutricional/100 g	Lombo de vaca	Lombo de porco	Peito de frango	Peito de peru	Coelho	Fonte
Água (g)	74,2	72,0	65,7	71,1	74,4	INSA, 2010
Proteína (g)	21,0	22,2	24,1	23,0	20,3	
Gordura total (g)	3,3	4,7	8,9	4,7	4,0	
Ácidos gordos saturados (g)	1,4	1,6	2,1	1,5	1,3	
Ácidos gordos monoinsaturados (g)	1,4	1,6	2,9	1,9	0,9	
Ácidos gordos polinsaturados (g)	0,2	0,8	1,6	1,2	0,7	
Colesterol (mg)	61	58	85	68	48	
Niacina (mg)	3,4	5,3	8,9	7,4	4,0	
Vitamina B6 (mg)	0,47	0,44	0,51	0,52	0,50	
Vitamina B12 (mg)	2,0	1,0	0,37	1,0	9,0	
Ferro (mg)	1,5	0,6	1,0	0,7	1,0	
Fósforo (mg)	145	221	200	200	220	
Potássio (mg)	370	396	321	330	376	

Ainda assim, o consumo regular de carne tem sido associado a um risco acrescido de doença coronária, devido à sua composição em gordura. A seleção genética dos animais, a sua alimentação selecionada, as técnicas de abate e sistemas de classificação de carcaças têm reunido condições para que seja possível a diminuição do teor em gordura e, conseqüentemente, o risco de doença (Higgs, 2002).

Devido aos estilos de vida de hoje, em que os consumidores investem menos tempo na preparação dos alimentos, estes devem ser seguros, convenientes e saudáveis (Becker, 2002), sendo a carne um suplemento nutricional com efeitos benéficos para a saúde, uma boa opção se ingerida em quantidades moderadas (Higgs, 2002).

1.4 Características de qualidade da carne suína

A carne suína é a proteína de origem animal mais consumida no mundo (Sarcinelli, Venturini e Silva, 2007), tendo ultrapassado a preferência pela carne bovina no ano de 1979 (Maganhini et al., 2007). É uma carne vermelha, com um sabor e tenrura característicos, cujo valor nutricional varia em função de vários fatores como a genética, idade, raça, sexo e manejo (Sarcinelli, Venturini e Silva, 2007). Os leitões, animais mais jovens, têm um menor teor de gordura, proteínas e minerais do que os adultos, sendo menos predispostos à acumulação de gordura intermuscular e subcutânea, o que lhes confere características tecnológicas e sensoriais diferentes (Magnoni e Pimentel, 2005).

A definição de qualidade da carne e a forma como esta pode ser mantida durante o processamento são de elevada importância para a indústria alimentar (Ledward, 2002). A qualidade é um conceito subjetivo pois depende da preferência, necessidades e objetivos do consumidor, mas, no outro extremo, é também um conceito objetivo e mensurável cientificamente. Pode ser definida, então, por atributos de qualidade, percebidos pelo consumidor e por características de qualidade, mensuráveis por métodos laboratoriais (Becker, 2002).

O consumidor em geral exige produtos com elevada qualidade sensorial, de consumo seguro, preço baixo, fáceis de preparar e com longo tempo de validade. Pode também ter em conta outros aspetos, como o impacto do produto alimentar na saúde e métodos de produção ecológicos. No que diz respeito aos produtos cárneos, as preferências do consumidor são principalmente influenciadas pela cor, suculência, tenrura e aroma, estando estes atributos relacionados com uma experiência alimentar agradável, sendo indicadores de qualidade. Existe também a preocupação com as condições em que os animais são criados, transportados e abatidos (Becker, 2002).

A definição de qualidade da carne suína é bastante complexa pois existe um grande número de fatores intrínsecos, relacionados com o animal, e extrínsecos, relacionados com todas as fases da cadeia de processamento, que influenciam as diferentes características de qualidade. Algumas destas características são o peso da carcaça, a cor da carne, a capacidade de retenção de água e o valor nutricional e sensorial (Bridi e Silva, 2012).

A gordura intramuscular é um atributo da qualidade, pois está diretamente relacionada com a tenrura, sabor, suculência e características visuais da carne. Para a obtenção de uma elevada qualidade sensorial é ideal a existência de uma razão de 2-4 % de gordura intramuscular (Bridi e Silva, 2012). Durante a mastigação, quanto maior o teor de gordura intramuscular, maior a quantidade que é libertada, ativando as glândulas salivares e libertando compostos aromáticos, o que resulta em excelentes características sensoriais (Miller, 2002).

Para além do teor em gordura intramuscular, a qualidade sensorial e tecnológica está relacionada também com a transformação de tecido muscular em carne. Esta conversão tem como principais fatores a quantidade de energia armazenada no músculo no abate, a velocidade da glicogénese no post-mortem e o tamanho final dos sarcómeros (Bridi e Silva, 2012). O músculo, sendo constituído por fibras musculares contrácteis, tem uma relação direta com a tenrura e suculência. Quanto maior a sua degradação, maior a tenrura (Miller, 2002). Sendo assim, a carne suína pode ser classificada em 4 categorias:

1. RFN (reddish-pink in color, firm in texture and non-exudative). Carne de alta qualidade, com cor característica, com textura firme e não exsudativa;
2. RES (reddish-pink in color but soft in texture and exudative). Carne com cor desejável, mas textura mole e baixa capacidade de retenção de água;
3. PSE (pale in color, soft in texture and exudative). Carne de cor pálida, textura mole e baixa capacidade de retenção de água. Tem um baixo rendimento tecnológico e pouca aceitação pelo consumidor;
4. DFD (dark in color, firm in texture and non-exudative). Carne de cor escura, de textura firme e com grande capacidade de retenção de água. Rejeitado pelo consumidor por não ser tenra e apresentar cor escura (Bridi e Silva, 2012).

A idade do animal influencia, também, a tenrura da carne. Quanto mais velho, maior a percentagem de ligações insolúveis de tecido conjuntivo, ou seja, maior a dureza e menor a qualidade (Miller, 2002).

Quanto ao maior fator visível que afeta a qualidade da carne, a cor, é um resultado da quantidade de mioglobina, o pigmento presente na carne, capaz de absorver ou refletir a luz. O seu teor no músculo é influenciado pela espécie, atividade do músculo em questão e idade do animal, estando presente em maior quantidade nos animais mais velhos. A intensidade da cor varia desde branco a vermelho escuro, quanto maior o teor de pigmento (Miller, 2002).

A qualidade engloba, também, a segurança dos produtos alimentares. A atividade da água e o teor abundante de nutrientes no músculo faz com que a carne seja um meio propício a crescimento microbiano. Nos animais, os locais com abundância de microbiota são a pele e o trato intestinal (Adams e Moss, 2008), daí serem imprescindíveis ótimas condições higiênicas em todas as etapas (Ribeiro, 1997), como o abate, processamento, embalagem e distribuição, pois os agentes patogênicos podem constituir um perigo biológico para a segurança (McClure, 2002).

1.5 Microbiota presente na carne

A microbiologia é a ciência que estuda bactérias, fungos, protozoários e algas que interferem nas intrincadas cadeias alimentares (Adams e Moss, 2008).

Os alimentos que ingerimos raramente são esterilizados, ou seja, têm carga microbiana cuja composição depende de como os microrganismos se desenvolvem, sobrevivem e interagem com o alimento. Estes microrganismos fazem parte da microbiota natural e dos vários processos alimentares, como o abate/colheita, armazenamento e distribuição. O balanço entre as várias estirpes vai depender das propriedades do alimento, o ambiente de armazenamento, características dos microrganismos e os efeitos do processamento. Na maioria dos casos, esta microbiota não produz consequências nos consumidores, mas, em alguns dos casos, pode causar doenças de origem alimentar e deterioração das características de qualidade dos alimentos. Os alimentos, pela sua natureza, são nutritivos, logo, oferecem substrato para o crescimento e desenvolvimento de microbiota. Todos os animais saudáveis contêm uma microbiota complexa que pode ser especializada e adaptada ao crescimento e sobrevivência no seu hospedeiro. Esta consiste em vários tipos de microrganismos que se traduzem em diferentes condições de crescimento. A superfície da pele dos humanos e dos animais está exposta ao ar, ao solo e à água, o que pode resultar em contaminação microbiana de alimentos, de equipamentos e de superfícies (Adams e Moss, 2008).

De forma a evitar que a presença de microrganismos seja uma fonte de doença para o consumidor, é necessário destruí-los ou manipular o alimento para que o

crescimento dos mesmos seja prevenido, sendo necessário utilizar diferentes medidas de controlo. Para ocorrer crescimento microbiano é necessária a presença de pelo menos uma célula viável, sendo que a taxa de crescimento aumenta com a quantidade de biomassa presente (Adams e Moss, 2008). O crescimento dos microrganismos, em condições favoráveis, ocorre segundo a curva de crescimento, retratada na figura 13.

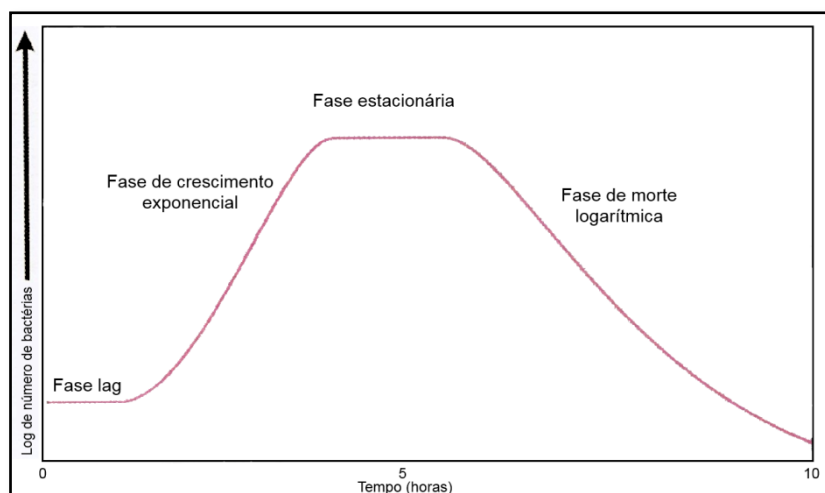


Figura 13 – Curva de crescimento microbiano

Esta divide-se em 4 fases principais: A fase lag, onde não há crescimento aparente pois o inóculo está a adaptar-se ao novo meio; a fase log ou exponencial, caracterizada por um aumento exponencial no número de células, em que é possível obter a taxa específica de crescimento do microrganismo (μ); a fase estacionária, em que os nutrientes do meio escasseiam, são acumulados produtos tóxicos e existe uma concentração máxima de biomassa e; a fase de morte logarítmica, em que as células perdem a capacidade de divisão celular de forma irreversível, ocorrendo uma diminuição exponencial do número de células com o tempo (Adams e Moss, 2008).

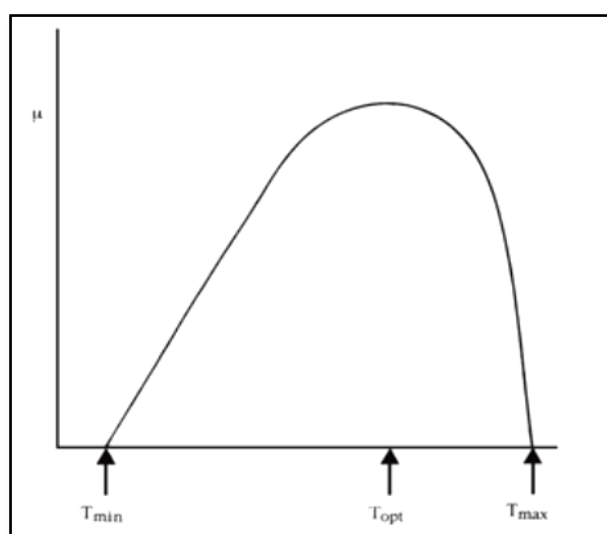
O desenvolvimento microbiano depende de vários fatores, como por exemplo, a temperatura, o pH do alimento e a atividade da água. Cada microrganismo tem um mínimo, um ótimo e um máximo de temperatura característico a que se desenvolve (Adams e Moss, 2008). Existem quatro grandes grupos de microrganismos, classificados segundo as suas temperaturas específicas, especificados no Quadro 3.

Quadro 3 – Classificação de microrganismos segundo as suas temperaturas específicas

Microrganismos	Temperatura mínima (°C)	Temperatura ótima (°C)	Temperatura máxima (°C)	Fonte
Psicrófilos	-5 - 5	12 - 15	15 - 20	Adams e Moss, 2008
Mesófilos	5 - 15	30 - 40	40 - 47	
Termófilos	40 - 45	55 - 75	60 - 90	
Hipertermófilos	90 - 100	100 - 105	110 - 115	

Na microbiota da carne, os mesófilos são os microrganismos de maior importância. Com temperaturas ótimas de 37 °C, são de origem humana ou animal e contêm muitos dos patogênicos mais comuns, como *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*. Como regra, os mesófilos, a temperaturas de refrigeração, têm taxas de crescimento baixas, logo, a deterioração dos alimentos é menor (Adams e Moss, 2008).

A curva de crescimento com a temperatura, representada na figura 14, é assimétrica, ou seja, o crescimento diminui mais rapidamente acima da temperatura ótima, do que abaixo. Isto acontece porque as temperaturas baixas causam modificações na estrutura da membrana celular que afetam o fornecimento de nutrientes aos sistemas enzimáticos e, acima da temperatura ótima, a taxa de crescimento diminui devido à desnaturação proteica e destruição da membrana celular. As células são destruídas pois os seus componentes chave são destruídos e não podem ser substituídos (Herbert e Sutherland, 2000).

**Figura 14** – Efeito da temperatura na taxa de crescimento microbiana (adaptado de Herbert e Sutherland, 2000)

A figura 15 revela o pH de vários tipos de alimentos, sendo o da carne entre 5,8 e 6,3.

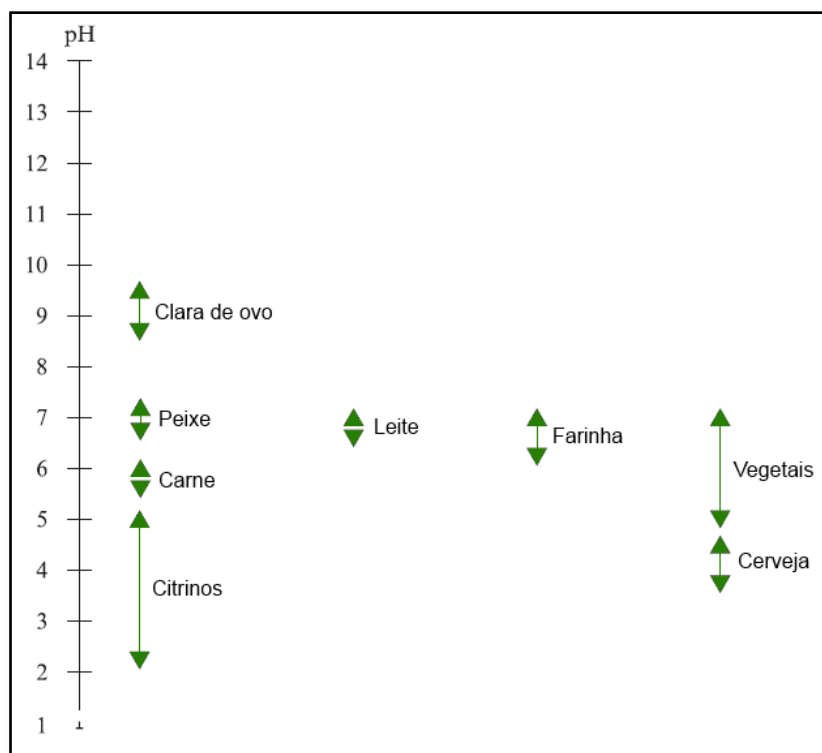


Figura 15 – Valores de pH de alimentos
(adaptado de Adams e Moss, 2008)

Um pH baixo restringe o crescimento microbiano, logo, os alimentos mais ácidos são mais seguros do ponto de vista microbiológico. Mas, no que diz respeito à carne, o pH ótimo para o desenvolvimento de bactérias da sua microbiota natural é entre 6 e 8, ou seja, é um produto suscetível de perigos de origem microbiológica (Adams e Moss, 2008).

No que diz respeito à atividade da água, representado por a_w , é uma medida de água disponível ou livre num alimento. O Quadro 4 explicita alguns alimentos e a atividade da água correspondente.

Quadro 4 – Atividade da água de alimentos

Actividade da água (a_w)	Alimento	Fonte
1,000	Água pura	Pampulha e Oliveira, 2009
0,995	Carne	
0,950	Pão	
0,900	Fiambre	
0,850	Salame	
0,800	Compotas	
0,700	Cereais e frutas secas	

Um a_w menor que 0,6 restringe o crescimento microbiano e, quanto mais elevado, maior a presença de bactérias, bolores e leveduras nos alimentos. A carne tem valores elevados, entre 0,96 e 0,98, o que significa que a capacidade de desenvolvimento dos microrganismos é muito alta (Adams e Moss, 2008).

Na carne há diversos tipos de microrganismos, como as bactérias lácticas, bolores e leveduras, gêneros da família Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* (Pereira, 2009). No âmbito desta dissertação serão descritas quatro bactérias patogénicas, devido à grande probabilidade de presença e desenvolvimento em carne suína, à sua vasta ligação a doenças do foro alimentar e por serem indicadores de segurança nos alimentos. Estas são: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*.

1.5.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um habitante universal do intestino humano e de outros animais de sangue quente. É comum a sua presença em fezes, ou seja, é um indicador de contaminação fecal em água e alimentos. Sendo a sua presença normalmente inofensiva, pode ser um patogénico oportunista que causa várias infeções (Willshaw, Cheasty e Smith, 2000).

É um microrganismo mesófilo capaz de se desenvolver de 7 °C a 50 °C, com uma temperatura ótima de 37 °C. Não é resistente a temperaturas altas, mas pode sobreviver a baixas temperaturas de refrigeração ou congelação durante longos períodos. O pH ótimo é o neutro, mas pode desenvolver-se em ambientes ácidos abaixo de 4,4. O valor mínimo de atividade da água ou a_w é 0,95. Existem várias categorias de *E. coli*, com propriedades distintas e que causam sintomas diferentes quando são ingeridos alimentos contaminados, sendo as mais comuns especificadas no Quadro 5 (Adams e Moss, 2008).

Quadro 5 – Classificação de *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i>	Período de incubação pós-ingestão	Sintomas	Duração dos sintomas	Fonte
Enterotoxigénica (ETEC)	12 a 36 horas	Diarreia Dores abdominais Vómitos	2 a 3 dias	Adams e Moss, 2008
Enteroinvasiva (EIEC)	-	Disenteria bacteriana Úlceras e inflamação do cólon Dores abdominais severas Diarreia hemorrágica	-	
Enteropatogénica (EPEC)	12 a 36 horas	Vómitos Diarreia, por vezes, hemorrágica	Pode persistir por mais de duas semanas	Willshaw, Cheasty e Smith, 2000
Enterohemorrágica (EHEC)	1 a 8 dias	Diarreia Insuficiência renal Trombocitopenia	-	

A carne e o leite são os alimentos que mais apresentam contaminação com *E.coli* devido a processos de aquecimento e cozimento inadequados e insuficientes. Para além destes, os alimentos podem ser contaminados quando manuseados sem regras de higiene no seu processamento e preparação (Adams e Moss, 2008).

1.5.2 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria que causa uma doença em humanos denominada listeriose, sendo transmitida pela ingestão de alimentos contaminados. Tem como características a capacidade de crescimento a uma larga gama de temperatura, entre os 0 e os 42 °C, com uma temperatura ótima entre 30 e 35 °C. Abaixo dos 5 °C o crescimento é bastante lento e este é inibido a valores de pH abaixo de 5,5 (Adams e Moss, 2008).

Está presente em ambientes diversos, como água doce, água salgada, solo e vegetação, sendo comum os humanos e animais serem portadores assintomáticos. Só resulta numa infeção quando o indivíduo tem o sistema imunitário debilitado, sendo de severa gravidade para mulheres grávidas. Os sintomas variam entre febre baixa, dores de cabeça, problemas gastrointestinais e meningite, podendo ser fatal. Em mulheres grávidas, a infeção pode ser transmitida ao feto, o que resulta em aborto ou parto prematuro. Os períodos de incubação da doença variam entre 1 a 90 dias, sendo uma razão para que seja difícil identificar qual o alimento contaminado que foi consumido (Farber e Peterkin, 2000).

Carne e os seus subprodutos, leite, queijos de pasta mole, alface e tomate são alguns dos alimentos associados a surtos de listeriose. Sendo a *Listeria monocytogenes* uma bactéria existente nos mais variados ambientes e com capacidade de desenvolvimento em alimentos não-ácidos, esta pode entrar facilmente nas cadeias alimentares de diversos produtos (Adams e Moss, 2008).

1.5.3 *Salmonella*

A *Salmonella* é uma das principais causas de doença alimentar em todo o mundo. Existe no trato intestinal de vários animais, como aves, roedores, répteis e insetos. Pode ser disseminada via fezes para o solo e água, dando-se a transmissão fecal-oral quando são ingeridos alimentos ou água contaminados com as fezes de animais infetados. A transmissão humana pode ocorrer se as mãos contaminadas de um manipulador de alimentos tocarem um alimento que irá ser consumido sem preparação adequada (D'aoust, 2000).

O crescimento desta bactéria ocorre a temperaturas acima de 5 °C até 47 °C, com uma temperatura ótima de 37 °C. São sensíveis ao calor e facilmente destruídas a temperaturas de pasteurização. Em congelados, o número de colónias diminui gradualmente, quanto menor a temperatura de conservação. O a_w mínimo para crescimento é 0,93 e o pH entre 4 e 5, com um ótimo de cerca de 7 (Adams e Moss, 2008).

A *Salmonella* é responsável por diferentes doenças agrupadas em enterites e doenças sistémicas, sendo a febre tifóide a consequência mais severa. Enterites são infeções gastrointestinais que podem variar entre serem assintomáticas a provocarem diarreia severa. O tempo de incubação é entre 6 e 48 horas, sendo os principais sintomas febre, náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia que podem persistir por mais de uma semana. A doença é mais grave em crianças, idosos e pessoas com baixas defesas imunológicas. Quanto à febre tifóide, uma doença sistémica, esta tem um período de incubação de 3 a 56 dias. As bactérias invasivas penetram o epitélio intestinal e são depois libertadas na corrente sanguínea, sendo disseminadas por todo o corpo. Em casos mais graves, poderá existir perfuração do intestino, levando a peritonite e, nos casos menos graves, o doente recupera após 4 a 5 semanas. Após o desaparecimento dos sintomas, o indivíduo pode ser portador assintomático de *Salmonella* por meses ou anos (Adams e Moss, 2008).

Uma falha no controlo de temperatura, tratamentos térmicos inadequados ou contaminações cruzadas de forma direta ou por equipamentos e utensílios de cozinha podem fazer com que a *Salmonella* se desenvolva em alimentos, originando um surto

da doença, sendo a carne, o leite e os ovos os veículos primários da doença. A contaminação de ovos com *Salmonella* é um problema recorrente, sendo a principal causa a contaminação do exterior da casca com matéria fecal. A casca contamina depois o interior do ovo quando este é partido, sendo difícil evitar o contacto com fragmentos de casca, principalmente quando são partidas grandes quantidades de ovo (Adams e Moss, 2008).

Foram sendo implementadas medidas, como análises microbiológicas, práticas de higiene e vacinação de aves, o que tem vindo a fazer com que haja uma diminuição substancial de infeções de *Salmonella* em humanos desde o ano de 1997 (Adams e Moss, 2008).

1.5.4 *Staphylococcus aureus*

Existem 27 espécies e 7 subespécies do género *Staphylococcus*, sendo uma bactéria Gram-positiva, que forma células esféricas ou ovais com 1 µm de diâmetro, como representado na figura 16 (Baird-Parker, 2000).

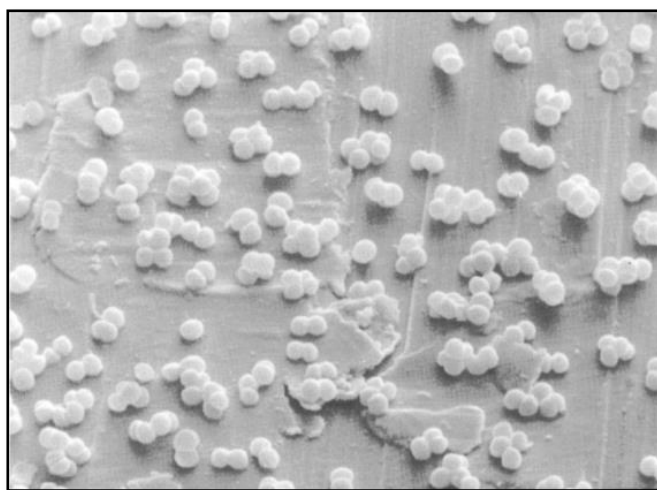


Figura 16 – *Staphylococcus aureus* (adaptado de Adams e Moss, 2008)

Produce pelo menos 11 enterotoxinas diferentes, sendo os tipos A e D mais frequentemente responsáveis por surtos de doença (Adams e Moss, 2008).

É um mesófilo, com uma gama de temperaturas de crescimento entre 7 e 48 °C, com uma temperatura ótima de 37 °C, sendo excecionalmente resistente ao calor. O pH ótimo é de 6 a 7, com mínimos e máximos de 4 e 10, tendo a capacidade de se desenvolver em meios com teores de sal elevados e a_w reduzido, de cerca de 0,83 (Adams e Moss, 2008).

O género *Staphylococcus* está naturalmente presente na pele de animais de sangue quente. Nos humanos, é encontrada nas vias respiratórias, nariz e garganta. Pode ser isolado de fezes e de vários ambientes, como o solo, água, pó e ar. O período de incubação da infeção alimentar é, tipicamente, de 2 a 4 horas. Os sintomas são náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia, sendo que a recuperação completa demora 1 a 2 dias (Baird-Parker, 2000).

A presença de *Staphylococcus aureus* em alimentos é comum. Para além de ser um microrganismo naturalmente presente nos animais e em diversos ambientes, os alimentos podem ser contaminados ao estarem expostos a lesões na pele, à tosse e aos espirros de quem manipula os produtos alimentares. Os alimentos mais prováveis de estarem contaminados são carne, leite, fiambre, comidas enlatadas, queijo e alimentos que requerem muita manipulação, como as bolas de arroz, típicas do Japão, que são moldadas com as palmas das mãos (Adams e Moss, 2008). Os pratos preparados com muita antecedência, sujeitos a arrefecimentos lentos ou insuficientemente reaquecidos são também causas frequentes de toxinfecções (Gil, 2000).

O Quadro 6 resume as características dos quatro microrganismos mencionados.

Quadro 6 – Resumo das características dos microrganismos patogénicos

Microrganismo	T _{min} (°C)	T _{opt} (°C)	T _{máx} (°C)	pH _{min}	pH _{opt}	a _w	Fonte
<i>Escherichia coli</i>	7	37	50	4,4	7	0,95	Adams e Moss, 2008
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	30 a 35	42	5,5	7	0,92	
<i>Salmonella</i>	5	37	47	4 a 5	7	0,93	
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	37	48	4	6 a 7	0,83	

1.6 Alterações da carne durante o processamento térmico

Os processamentos a altas temperaturas podem causar desnaturação proteica em carnes. A presença de gordura fornece proteção contra este efeito negativo por isolar ou diminuir a transferência de calor. O aquecimento e processamento da carne podem também quebrar ou solubilizar uma parte das ligações de tecido conjuntivo, tornando-a mais macia (Miller, 2002). No caso particular da carne de leitão, esta, por ser de um animal jovem, possui um maior teor de colagénio na sua composição que, com o processamento térmico, transforma-se em gelatina, fazendo com que a carne se torne mais tenra (Embrapa, s.d.).

Os constituintes da carne são sujeitos a uma série de reações térmicas que libertam um grande número de compostos voláteis. Estes compostos que contribuem

para o *flavour* são, na sua maioria, aminoácidos, péptidos e ácidos orgânicos. A formação de aromas desejáveis está também dependente do teor de gordura intramuscular, ou seja, dos componentes lipídicos da carne, das reações de Maillard que ocorrem durante o processamento e de reações de compostos solúveis, existindo, assim, vários componentes responsáveis pelo aroma da carne (Sahidi, 2002).

Durante o processamento, pode existir a geração de aromas indesejáveis devido a alterações oxidativas térmicas moderadas que produzem compostos de sabor importantes (Sahidi, 2002).

Do ponto de vista microbiológico, o processamento térmico de carne destrói a maioria da microbiota à superfície. Mas, ainda assim, é necessário ter em conta que o calor pode não penetrar em algumas zonas e eliminar as bactérias que se encontram no centro da carcaça (Brown, 2000).

1.7 Conservação da carne

Desde a pré-história e a invenção da agricultura que as técnicas de preservação dos alimentos assumem cada vez mais importância. Foi a revolução industrial no final do século XVIII que, ao causar o aumento da população em centros urbanos, potenciou o desenvolvimento de vários tipos de conservação alimentar, como a refrigeração, congelação e apertização (Adams e Moss, 2008).

Hoje em dia, com o aumento da população mundial, com o enriquecimento do setor alimentar e as constantes mudanças de preferência dos consumidores é cada vez mais importante garantir uma rede de distribuição alimentar segura e métodos inovadores de conservação dos alimentos (Adams e Moss, 2008), que tem por objetivo evitar alterações organoléticas, prolongar o tempo de vida útil e preservar os alimentos, tendo em conta a constituição dos mesmos (Ribeiro, 1997).

As decomposições microbianas e químicas e os danos físicos são alterações que devem ser evitadas. Para isso, é necessário manter condições assépticas, remover microrganismos por lavagem e/ou destruí-los por tratamentos térmicos, reduzir a atividade microbiana por diminuição da temperatura, reduzir o teor de água, utilizar conservantes, evitar os danos físicos e, também, a decomposição química devido à atividade enzimática (Ribeiro, 1997).

Os agentes de alteração ou deterioração da carne, em particular, podem ser de origem físico-química, como oxidações lipídicas e desnaturação proteica, ou microbiológica. Estes agentes podem resultar em diminuição da qualidade sensorial, como perdas de *flavour* e textura, e em reduções no valor nutritivo, diminuindo, assim, o valor comercial (Ribeiro, 1997).

Os processos responsáveis pelas alterações de origem físico-química são as reações de oxidação que causam aromas característicos e indesejáveis, assim como alterações de cor (Sahidi, 2002).

A migração de humidade e de gordura é uma das principais causas de alterações físicas que deterioram os alimentos. Os produtos frescos perdem humidade e os que tem uma atividade da água baixa absorvem-na, assim como a gordura pode migrar de um componente para outro (FIB, 2011).

Quanto às alterações microbiológicas, estas são o resultado da ação de bactérias, bolores e leveduras, que decompõe as substâncias que constituem os alimentos, tornando-os impróprios para consumo (Ribeiro, 1997). O crescimento de microrganismos depende de vários fatores como a carga microbiana, o pH, o teor de humidade, o método de processamento utilizado e a temperatura de conservação. O Quadro 7 explicita alguns fatores que afetam o crescimento de alguns microrganismos patogénicos e de deterioração, como os fungos (FIB, 2011).

Quadro 7 - Condições mínimas de crescimento para microrganismos seleccionados

Microrganismo	pH	Aw	Temperatura (°C)	Crescimento anaeróbio	Fonte
<i>Bacillus cereus</i>	4,4	0,91	<4	Sim	FIB, 2011
<i>Escherichia coli</i>	4,4	0,95	7	Sim	
<i>Listeria monocytogenes</i>	4,3	0,92	0	Sim	
<i>Salmonella</i>	4,0	0,94	7	Sim	
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,0	0,83	6	Sim	
Fungos	<2,0	0,6	<0	Não	
Leveduras	1 a 5	0,8	- 5	Sim	
<i>Pseudomonas</i>	5,5	0,97	<0	Não	

O crescimento de microrganismos patogénicos que causam intoxicações alimentares, como *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, não implica obrigatoriamente alterações na aparência, *flavour* ou textura do alimento que possam ser detetadas pelos sentidos humanos (FIB, 2011). O Quadro 8 enumera os limites microbiológicos para a presença de microrganismos patogénicos em leitão assado.

Quadro 8 – Limites microbiológicos em leitão assado

Microorganismo	Limites máximos	Fonte
Mesófilos totais	3x10 ⁵ ufc/g	Especificações da Empresa
<i>Escherichia coli</i>	10 ufc/g	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausência em 25 g	
<i>Salmonella</i>	Ausência em 25 g	
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ² ufc/g	

Sendo o leitão um produto submetido a um tratamento térmico a 400 °C, a sua carga microbiana é eliminada. São as etapas seguintes, como o arrefecimento, acondicionamento, expedição e transporte que constituem riscos de contaminação por microrganismos patogénicos. Quanto ao crescimento de microrganismos de deterioração, estes podem gerar aromas indesejáveis e mudanças na textura, como perda de água e amolecimento, resultando em apodrecimento (FIB, 2011). Podem existir também alterações de cor, aparecendo tonalidades e reflexos esverdeados (Ribeiro, 1997).

A perda de qualidade dos produtos alimentares é sempre devido a uma ação combinada entre enzimas do próprio alimento e micróbios, tendo a temperatura uma grande influência na atividade das mesmas (Ribeiro, 1997).

Os diferentes métodos de conservação dos alimentos estão descritos na figura 17. Em todos estes processos, a aplicação de frio é o mais comum, pois não altera significativamente as características organolépticas dos alimentos (Ribeiro, 1997).

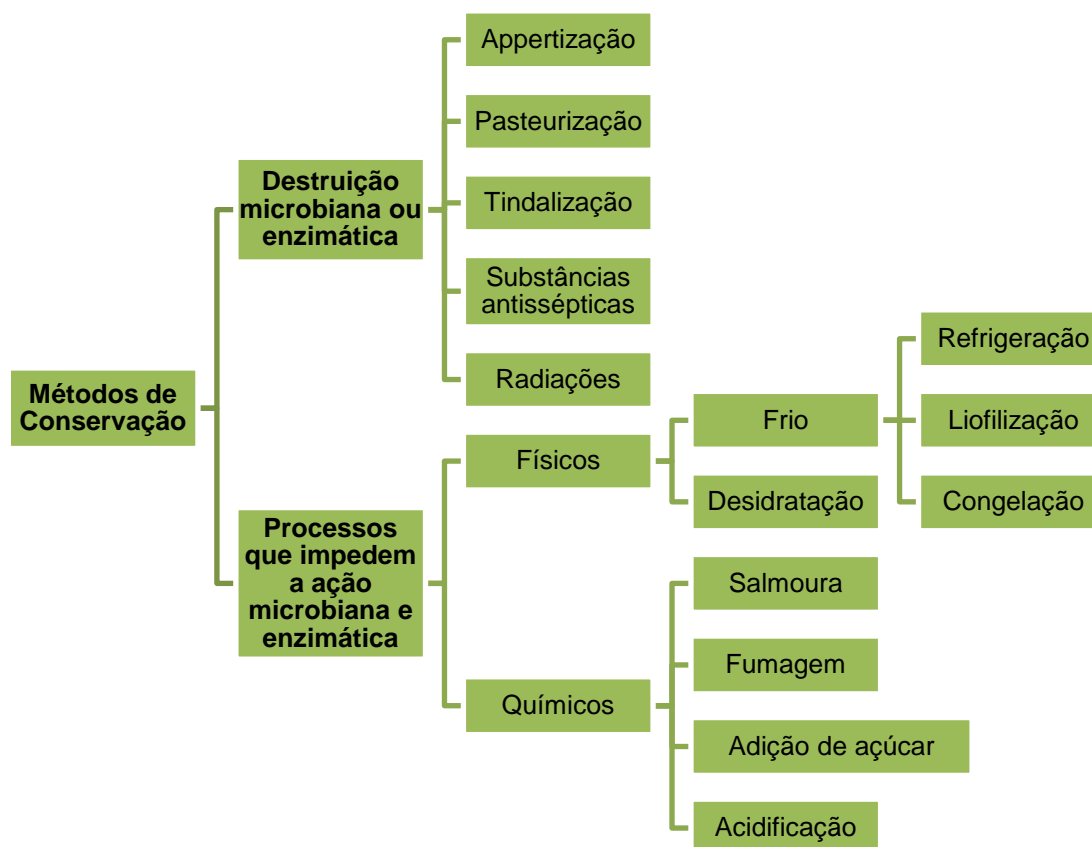


Figura 17 – Métodos de conservação dos alimentos (adaptado de Ribeiro, 1997)

Como o tempo de vida útil dos alimentos à temperatura ambiente é limitado pelo desenvolvimento microbiano e pelas modificações bioquímicas devido à atividade enzimática, é essencial que o alimento seja de ótima qualidade, seja aplicado frio o mais precocemente possível e que a cadeia de frio seja contínua e não tenha oscilações de temperatura significativas (Ribeiro, 1997).

1.7.1 Refrigeração

A refrigeração é um método de conservação pelo frio acima do ponto de congelação, ou seja, a temperaturas positivas (Ribeiro, 1997).

A utilização de matérias-primas com qualidade e manipulação higiénica são fatores essenciais para a produção de produtos refrigerados seguros (Adams e Moss, 2008).

Alimentos diferentes correspondem a diferentes temperaturas ótimas de refrigeração. Sendo assim, a carne e peixe devem ser conservados a temperaturas de 0 a 4 °C e as frutas e legumes numa gama de temperaturas de 6 a 8 °C. O tempo de vida útil de alimentos conservados a temperaturas de refrigeração também difere consoante o tipo de alimento, como demonstra o Quadro 9 (Ribeiro, 1997).

Quadro 9 – Tempo de vida útil de alimentos refrigerados

Alimento	Tempo de vida útil	Fonte
Carne picada Produtos Lácteos Peixe Legumes	2 – 3 dias	Ribeiro, 1997
Carne vermelha Carne de aves Produtos de salsicharia	3 – 5 dias	
Ovos	Semanas	
Frutas e bebidas hermeticamente fechadas	Meses	

A carne é um alimento muito perecível, quando armazenado à temperatura ambiente, podendo chegar ao limite do prazo de validade em poucas horas ou dias. Em condições de refrigeração, o tempo de armazenagem pode ser estendido até 6 semanas para alguns tipos de carne (Pereira, 2008).

Neste método de conservação há vários fatores a ter em conta. Um dos mais importantes é a humidade. Um teor elevado leva a crescimento de bolores e, por outro lado, um teor de humidade demasiado baixo leva a que o alimento perca água, resultando na diminuição das características de qualidade. É também importante utilizar uma embalagem adequada que impeça a desidratação dos alimentos, controlar a temperatura da câmara de refrigeração de forma eficaz para prevenir flutuações, evitar a sua abertura desnecessária, entre outros (Ribeiro, 1997). Este método tem sido cada vez mais utilizado pois os produtores conseguem adicionar valor aos seus produtos, os consumidores adquirem produtos frescos e convenientes e as cadeias de frio são cada vez mais eficientes, preservando a qualidade e reduzindo os perigos dos alimentos (Pereira, 2008; Herbert e Sutherland, 2000).

1.7.2 Congelação

A congelação é um método de refrigeração a temperaturas negativas em que ocorre um arrefecimento rápido até à congelação da água que constitui os alimentos, sendo atingida uma temperatura igual ou inferior a -10 °C no centro térmico (Ribeiro, 1997). É a melhor técnica de conservação a longo prazo, pois a maior parte da composição nutricional é preservada (Adams e Moss, 2008).

As temperaturas utilizadas em congelação são mais baixas do que 18°C negativos. A estas temperaturas, o crescimento microbiano é impossível, não só pela congelação, mas pela diminuição da atividade da água, como retratado no Quadro 10 (Adams e Moss, 2008).

Quadro 10 – Efeito da congelação no a_w de água pura

Temperatura (°C)	a_w	Fonte
0	1	Adams e Moss, 2008
-5	0,953	
-10	0,907	
-15	0,864	
-20	0,823	
-40	0,68	

À temperatura de congelação, ocorre morte e desintegração das células à medida que a temperatura decresce. A congelação da água em espaços intercelulares causa danos às células e desidrata-as devido às altas pressões osmóticas extracelulares. As mudanças na força iónica e pH da água destroem a estrutura e as funções de vários componentes celulares e macromoléculas. Abaixo dos -10 °C, é prevenido qualquer crescimento microbiano (Lund, 2000).

Para além da congelação, existe a ultracongelação, caracterizada por um arrefecimento extremamente rápido entre -40 e -80 °C, em que o centro térmico do alimento em questão atinge temperaturas iguais ou inferiores a -18 °C (Ribeiro, 1997).

Este processo deve ser o mais rápido possível para que a água forme pequenos cristais de gelo que não danifiquem as células de forma a não ocorrerem alterações enzimáticas. A par da rapidez, quanto mais baixa for a temperatura de congelação, menor a desidratação do produto (Ribeiro, 1997).

O material de embalagem mais indicado a ser utilizado é cartão canelado, pois protege os alimentos da luz e do oxigénio, prevenindo rancificações (Ribeiro, 1997).

O tempo de vida útil de produtos congelados é, normalmente, de 18 meses ou mais, dependendo da natureza e género dos produtos (Ribeiro, 1997). Assim como a refrigeração, a congelação não garante produtos seguros, pois a morte microbiana é limitada e algumas toxinas persistem no produto alimentar (Adams e Moss, 2008).

A descongelação deve ser feita num local limpo e com extração de água, pois esta é um meio ótimo de desenvolvimento microbiano. É um processo que pode ser realizado em períodos longos, em câmara fria; por 5 a 6 horas, num meio ambiente fresco e; em períodos muito curtos, quando os alimentos congelados são cozinhados diretamente (Ribeiro, 1997).

1.8 Avaliação do tempo de vida útil

Existindo uma tendência crescente de exigências por parte dos consumidores no que diz respeito à qualidade dos produtos que consomem, a expectativa de que tal qualidade irá ser mantida desde o ato da compra até ao ato de consumo (Pereira,

2008). O tempo de validade é uma das informações que a rotulagem dos produtos fornece ao consumidor. Dependendo do país e do tipo de produto a data de fim de validade é antecedida de “consumir antes de”, “consumir até” entre outras variantes, como a da figura 18 (FIB, 2011).



Figura 18 – Data de validade num rótulo de um produto alimentar (adaptado de FIB, 2011)

A definição de *shelf-life*, segundo as diretrizes do IFST (1993), é o tempo durante o qual o produto alimentar irá permanecer seguro, manterá as suas características sensoriais, químicas, físicas e microbiológicas e cumprirá com todas as declarações que constam no rótulo, quando armazenado nas condições recomendadas.

Em produtos de curto tempo de validade, como o caso do leite, as alterações microbiológicas são problemas de conservação de primordial importância, seguidos pelas alterações químicas e sensoriais. Com base nos padrões de crescimento dos microrganismos patogénicos, é possível prever o tempo de fim de validade, sob determinadas condições de armazenamento. Os critérios não-microbiológicos são mais difíceis de avaliar, embora seja possível analisar a diminuição do teor de vitaminas e a deterioração das características sensoriais ao longo do tempo de prateleira (FIB, 2011).

A medição da *shelf-life* ocorre em ambientes e condições controladas que raramente existem na prática. O abuso térmico nas cadeias de distribuição é frequente e, no ambiente doméstico, o controlo de temperatura dos frigoríficos e congeladores domésticos é fraco, sendo essencial para o fabricante de produtos alimentares conhecer o comportamento do produto sob condições de armazenamento, incluindo os

processos de deterioração mais complexos, de forma a definir um tempo de validade adequado e segundo as regulamentações (Kilcast e Subramaniam, 2000).

Há vários fatores intrínsecos e extrínsecos ao alimento que podem influenciar o seu tempo de validade. Os intrínsecos são as propriedades do produto final, como a atividade da água, o pH, potencial redox, teor nutricional, microrganismos presentes e uso de conservantes na formulação. Os fatores extrínsecos são aqueles aos quais o produto alimentar é submetido em toda a cadeia alimentar, como perfis variados de tempo/temperatura, exposição à luz, microrganismos depositados no produto por falta de condições higiênicas, composição da atmosfera dentro das embalagens, tratamentos térmicos posteriores e o manuseamento do consumidor (IFST, 1993). Todos estes fatores podem ter interações entre si e causar problemas imprevisíveis, sendo importante investigar a probabilidade de acontecerem (FIB, 2011).

Os fatores de deterioração anteriormente descritos podem resultar em vários tipos de alterações, dependendo do tipo de alimento. O Quadro 11 relaciona diversos tipos de alimento com as deteriorações que limitam a *shelf-life*.

Quadro 11 – Alterações nos alimentos

Alimento	Mecanismo de deterioração	Alteração	Fonte
Carne	Oxidação Crescimento microbiano	Perda de cor Rancidez Perda de <i>flavour</i>	FIB, 2011
Fruta	Quebra enzimática Crescimento de fungos Perda de humidade Oxidação	Amolecimento Bolor visível Aparência seca Escurecimento	
logurte	Sinéresis Crescimento microbiano	Separação do soro Bolor visível	
Pão	Retrogradação do amido Migração de humidade	Alterações de textura Desenvolvimento de fungos Textura seca	
Peixe	Crescimento microbiano Reações químicas	Perda de <i>flavour</i> Alterações na aparência	
Queijo	Oxidação Cristalização da lactose Crescimento microbiano	Rancidez Textura arenosa Bolor visível	

As medições de qualidade durante a *shelf-life* requerem o uso de técnicas sensoriais efetuadas por um painel de provadores treinado. Estas medições têm custos elevados e requerem muito tempo, resultando em avaliações com muita variabilidade. Sendo assim, para a obtenção de resultados fiáveis, é importante utilizar, também, métodos instrumentais. Texturómetros, reómetros e detetores de compostos voláteis são alguns desses instrumentos que possibilitam analisar as

propriedades sensoriais (Kilcast e Subramaniam, 2000). O Quadro 12 enumera alguns parâmetros de qualidade e os instrumentos utilizados na sua medição.

Quadro 12 – Tipos de instrumentos utilizados para avaliar a *shelf-life*

Parâmetros de qualidade	Tipo de instrumento	Fonte
Cor	Medidor de luz ultravioleta Sensor infravermelho Imagiologia	Kilcast e Subramaniam, 2000
Temperatura	Termómetro Sensor infravermelho Sonda de fibra-ótica	
Textura	Texturómetro Reómetro	
Humidade	Higrómetro	
a_w	Radiação microondas Condutividade eléctrica	
pH	Biossensores Imunossensores	

Quanto à estabilidade microbiológica dos alimentos, há dois aspetos importantes na sua determinação. Estes são o desenvolvimento microbiano, que leva à deterioração do produto, e o crescimento de bactérias patogénicas, que comprometem a sua segurança (Kilcast e Subramaniam, 2000).

O tempo de vida útil pode ser determinado por armazenar o produto nas condições devidas e acompanhar, por meio de medições, o comportamento da microbiota em determinados intervalos de tempo. O ponto de paragem das medições ocorre quando as contagens microbianas atingem um nível pré-definido ou é atingido o limite da *shelf-life* do alimento a analisar (Kilcast e Subramaniam, 2000).

Um *challenge test* pode ser aplicado para determinar e estudar o crescimento de microrganismos específicos, como por exemplo, os patogénicos, que podem contaminar o alimento por falta de higiene na produção e manipulação. Neste caso, os microrganismos selecionados são inoculados nos produtos e o desenvolvimento destes é monitorizado (Kilcast e Subramaniam, 2000). Este é utilizado para avaliar o efeito da armazenagem no produto final, simulando situações de abuso que podem acontecer durante a distribuição ou manipulação (Pereira, 2008)

A escolha dos microrganismos do *challenge test* é muito importante, pois devem representar uma microbiota que possa causar alterações no produto, devendo o seu crescimento ser monitorizado no alimento em questão e a quantidade de biomassa ser suficientemente elevada para permitir a sua deteção facilmente. Os critérios de aceitabilidade do produto devem ser previamente definidos de forma a poder tirar conclusões sobre a segurança do produto alimentar (Pereira, 2008).

Existem várias formas de prolongar a *shelf-life* de um produto alimentar, como por exemplo, partir de matérias-primas de qualidade, aplicar técnicas de processamento e preservação, utilizar embalagens adequadas e controlar o armazenamento e distribuição (FIB, 2011).

O leitão, sendo um produto cárneo, tem um tempo de validade de 5 dias após a assadura, a uma temperatura entre 0 e 7 °C (Florêncio e Marta, 2005).

2. ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS

Sendo o leitão assado um produto tradicional português, comercializado apenas regionalmente, são muito poucos os estudos efetuados sobre a sua qualidade e segurança. Segundo o Regulamento (CE) nº 854/2004, o controlo dos produtos de origem animal deve abranger todos os aspetos importantes para a proteção da saúde pública, devendo basear-se nas informações mais pertinentes.

A partir do momento em que as matérias-primas dos alimentos começam a ser manipuladas, é iniciado um processo de contaminação, sendo o Homem e os equipamentos utilizados os principais responsáveis. Sendo assim, é necessário ter em conta a probabilidade de contaminação por microrganismos patogénicos. Um ensaio microbiológico pode identificar a causa de deterioração ou a presença de patogénicos quando o alimento é a causa de uma doença alimentar.

A presente dissertação foi realizada com a colaboração de uma empresa de transformação e comércio de leitão, de modo a elaborar e validar o plano HACCP, mais concretamente no que diz respeito aos perigos microbiológicos associados ao produto. Foram realizados diversos ensaios microbiológicos de forma a estudar os seguintes aspetos:

- ▲ Microbiota no produto alimentar pós-processamento;
- ▲ Evolução da microbiota durante o prazo de validade do produto determinando o teor em microrganismos aeróbios totais e;
- ▲ Comportamento de algumas bactérias patogénicas (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*) na carne processada, recorrendo a um *challenge test*.

Para além dos ensaios mencionados acima, foram efetuados testes sensoriais ao alimento, principalmente no que diz respeito ao aspeto visual, de forma a tirar conclusões sobre a aceitação do produto pelo consumidor dentro do prazo de validade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Colheita de amostras

Uma amostra é uma quantidade do produto a analisar representativa das suas características globais (Florêncio e Marta, 2005).

As amostras foram recolhidas nos dias 28 de maio, 25 de junho, 23 de julho, 6 de agosto e 20 de agosto de 2014, segundo a NP 1828:1982, respetiva à colheita e envio de amostras para análises microbiológicas.

As carcaças de leitão utilizadas neste estudo tinham uma média de 6 kg, após o processo mencionado no ponto 1.2.3 desta dissertação.

Foram colhidas várias amostras, consoante o tipo de ensaio a efetuar, de 150 a 200 g, de três zonas diferentes de cada carcaça (cachaço, lombo e perna) como demonstrado na figura 19.

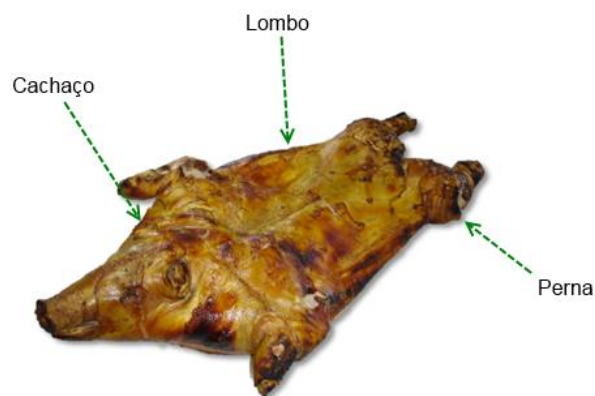


Figura 19 – Zonas da carcaça utilizadas para amostragem

A escolha dos locais de amostragem da carcaça teve por objetivo avaliar a uniformidade do processo de assadura e do rácio gordura/músculo de cada local, avaliando o impacto destas variáveis na microbiota.

O processo de colheita de amostras foi efetuado com as carcaças de leitão ainda quentes, após a assadura, recorrendo aos utensílios esterilizados da empresa em questão.

As amostras foram embaladas em papel vegetal, conforme representado na figura 20, e colocadas numa caixa plástica própria para transportar alimentos de forma a simular o processo de compra. Foram depois transportadas para o laboratório sendo examinadas, no máximo, dentro de 2 horas.



Figura 20 – Amostras de leitão embaladas

Durante o período de tempo em que as análises decorreram, as amostras foram mantidas num frigorífico, no laboratório de microbiologia do Instituto Superior de Agronomia, com temperaturas de refrigeração entre 8 e 10 °C.

3.2 Preparação das amostras

A preparação da amostra para análises microbiológica é o processo de a tornar apta à quantificação e caracterização da microbiota nela existente, por unidade de massa ou volume (Florêncio e Marta, 2005), sendo esta efetuada segundo a NP 1829:1982.

Todos os ensaios foram realizados segundo o calendário do Quadro 13, no qual o dia zero corresponde ao dia da assadura.

Quadro 13 – Calendarização das análises microbiológicas

Amostra	Dias															
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Cachaço																
Lombo	t ₀		t ₁			t ₂			t ₃							t ₄
Perna																

Legenda:

Análise microbiológica
Refrigeração

As amostras de leite foram retiradas das embalagens de forma asséptica e divididas em cinco partes, de acordo com os cinco dias de análise por ensaio, seguindo a razão de 10 g de amostra para 90 mL de solução de Ringer cada.

A solução de Ringer é um diluente utilizado para preparar soluções em estudos bacteriológicos. A sua preparação consiste em dissolver uma pastilha em 500 mL de água destilada, sendo depois esterilizado a 121 °C durante 15 minutos na autoclave e conservado à temperatura ambiente até à sua utilização (Merck, 2014).

Assepticamente, os 10 g de amostra foram colocados num *Stomacher Bag* e os 90 mL de solução de Ringer vertidos, recorrendo a uma proveta.

A trituração no *Stomacher* foi o passo seguinte, sendo obtida uma suspensão-mãe, de diluição equivalente a 10^{-1} , como representado na figura 21.



Figura 21 – *Stomacher* e suspensão-mãe

A diluição é o processo de redução do número de microrganismos por unidade de volume, de modo a ser possível a sua pesquisa e contagem numa quantidade conhecida de amostra (Florêncio e Marta, 2005).

São obtidos resultados adequados quando as placas têm entre 30 e 300 colónias, pois, caso contrário, seria difícil contá-las e obter resultados satisfatórios e representativos (Adams e Moss, 2008).

As diluições necessárias foram feitas de acordo com a NP 3005:1985, em tubos de ensaio com 9 mL de solução de Ringer, como ilustrado na figura 22.

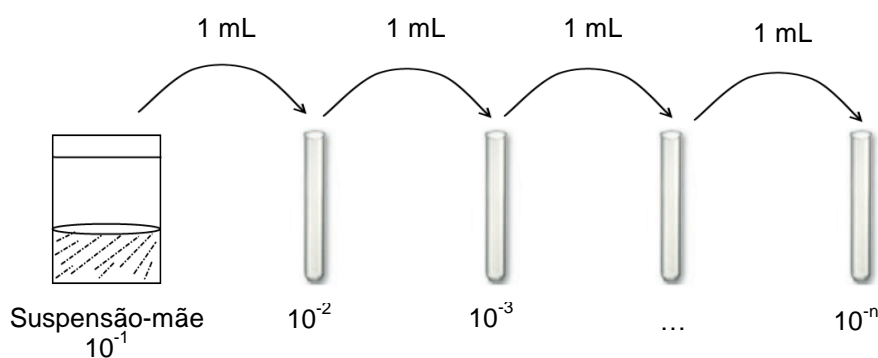


Figura 22 – Diluições realizadas nas amostras

3.3 Determinação do tempo de vida útil

Para a determinação do tempo de validade do leitão assado foram analisados os mesófilos aeróbios totais presentes na microbiota do produto, de forma a obter uma representação gráfica dos valores das contagens em função do tempo, tendo em conta os valores legislados no que diz respeito a produtos cárneos.

A contagem de mesófilos totais foi utilizada como um indicador de qualidade microbiológica (Adams e Moss, 2008).

Para isto, foram realizadas diluições em duplicado a 10^{-1} e 10^{-2} e utilizado *Plate Count Agar* (PCA) como meio de cultura, por ter as condições necessárias ao crescimento de mesófilos totais, estando este procedimento de acordo com a NP 4405:2002, que regulamenta a quantificação de mesófilos aeróbios totais a 30 °C.

Para uma análise completa é necessário que haja crescimento de microrganismos individuais em meio líquido ou numa superfície de um meio solidificado com agar (Adams e Moss, 2008).

O *Plate Count Agar* não contém agentes inibitórios mas é seletivo pois não tem nutrientes específicos requeridos por organismos exigentes (Adams e Moss, 2008).

Para a preparação de PCA, foram dissolvidas 20,5 g de meio de cultura desidratado a 1 L de água quente destilada. De seguida, o meio é autoclavado a 121 °C por 15 minutos sendo depois colocado num banho a 60 °C, de forma a não solidificar (HIMEDIA, 2011).

Os ensaios laboratoriais foram efectuados de acordo com a figura 23.

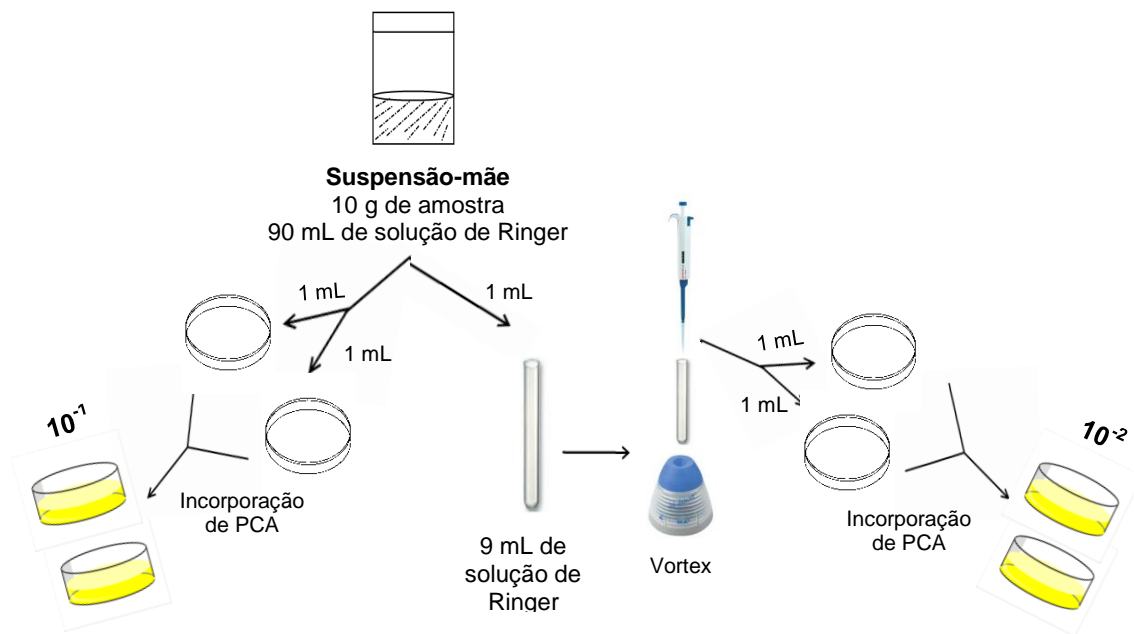


Figura 23 – Determinação de mesófilos totais

Este procedimento foi efetuado para as três diferentes partes da carcaça (cachaço, lombo e perna), sendo adicionados por incorporação cerca de 15 mL de PCA às placas de Petri, em duplicado, inoculadas com 1 mL de amostra.

Após a solidificação do meio de cultura, em câmara de fluxo laminar, procedeu-se à incubação durante 72 horas a 30 °C e à contagem posterior das colônias, de aspecto similar às da figura 24.



Figura 24 – Mesófilos aeróbicos totais em Plate Count Agar

Os resultados das contagens foram depois calculados segundo a seguinte fórmula:

$$N = \frac{\bar{X}}{V \times d}$$

Onde,

N = ufc/g;

\bar{X} = média de contagens por placa;

V = volume de amostra;

d = factor de diluição.

A determinação foi feita em triplicado, ou seja, um leitão de lote diferente e dois do mesmo lote, de forma a avaliar a uniformidade dos resultados.

3.4 Challenge test

Foi realizado um *challenge test* com o objetivo de estudar o crescimento e a sobrevivência de bactérias patogénicas, associadas a doenças alimentares, ao longo do tempo, a uma temperatura de refrigeração de 8 a 10 °C.

A par da contabilização das colónias de bactérias patogénicas, foram também contabilizados os mesófilos totais, segundo o procedimento descrito no ponto 3.3 desta dissertação.

3.4.1 Preparação do inóculo

As bactérias inoculadas foram *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

Estes microrganismos foram inoculados em *Tryptone Soya Broth* (TSB), um meio líquido de cultura, e incubados por 24 horas a 37 °C.

Para a preparação de TSB foram dissolvidas 15 g do meio de cultura desidratado em 500 mL de água destilada, sendo depois autoclavado a 121 °C durante 15 minutos e, de seguida, colocado num banho a 60 °C até à sua utilização (Oxoid, 2014).

Após as 24 horas de incubação, os inóculos foram distribuídos por 3 *falcons* com 10 mL cada e centrifugados a 3000 G por 10 minutos, de forma a obter duas fases, o sobrenadante e o sedimento, ou seja, as colónias de bactérias. Este sedimento foi lavado com 10 mL de solução de Ringer e centrifugado novamente

durante 5 minutos. De seguida foram adicionados 30 mL de solução de Ringer e, por fim, o sedimento foi descolado recorrendo a um vortex, de forma a ser possível continuar a preparação dos inóculos.

O procedimento, repetido para as 4 bactérias, está representado na figura 25.

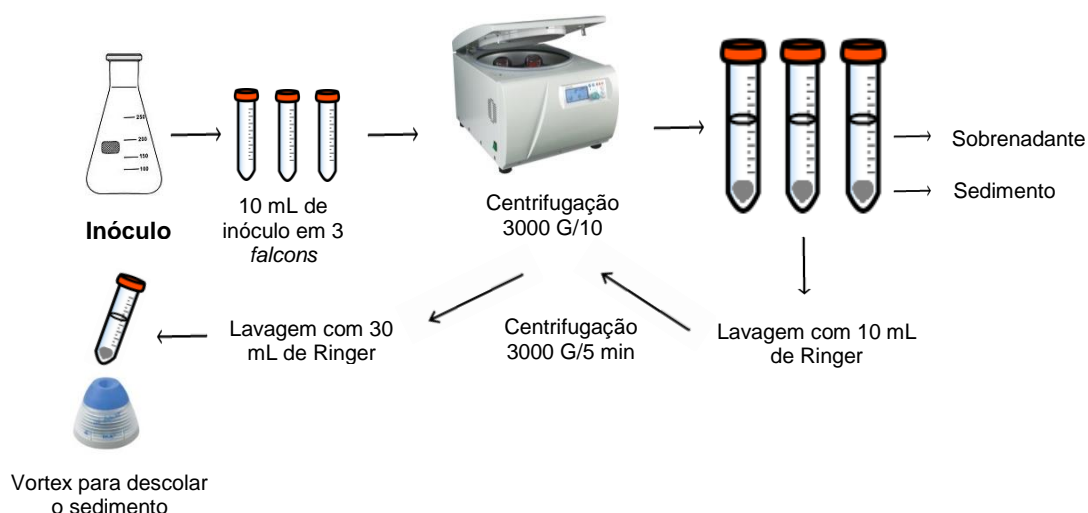


Figura 25 – Preparação dos inóculos

Para o acerto das suspensões a 10^8 , recorreu-se à espectrofotometria, comprimento de onda de 600 nm de forma a avaliar a concentração de biomassa. Foi preparada uma cuvette com 2 mL de Ringer, para ser utilizada como branco e outra com 1 mL de inóculo e 1 mL de solução de Ringer, de forma a acertar a solução final e obter uma absorvância de 0,5.

A concentração foi confirmada por contagem direta do número de células em placa.

3.4.2 Preparação das amostras

Para o *challenge test*, foram necessárias 4 amostras, de forma a inocular cada uma com um microrganismo diferente, mergulhando-as na suspensão.

As amostras foram preparadas como mencionado no ponto 3.2 desta dissertação, sendo a única diferença, a pesagem de 5 g de amostra para 45 mL de solução de Ringer.

As diluições realizadas foram 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , para que as colónias pudessem ser contabilizadas adequadamente.

O isolamento de patógenos específicos requer procedimentos elaborados envolvendo meios de cultura enriquecidos. Estes meios contêm um ou mais compostos que são inibitórios da maioria dos microrganismos (Adams e Moss, 2008).

3.4.3 *Escherichia coli*

Para a contagem de colónias de *Escherichia coli* foi utilizado *Tryptone Bile X-Glucuronide* (TBX), um meio de cultura seletivo.

Para a preparação de TBX foram dissolvidas 20,45 g do meio de cultura desidratado em 1 L de água quente destilada, sendo depois autoclavado a 121 °C durante 15 minutos e, de seguida, colocado num banho a 60 °C até à sua utilização (Oxoid, 2014).

A inoculação foi feita por incorporação de 1 mL de amostra em cerca de 15 mL de TBX, em duplicado, sendo as respetivas placas incubadas a 44 °C durante 18 a 24 horas e os resultados expressos em ufc/g, sendo o procedimento efectuado segundo a ISO 16649-2:2001.

As colónias de *Escherichia coli* em TBX são azuis e têm um aspeto similar às da figura 26.



Figura 26 – *Escherichia coli* em *Tryptone Bile X-Glucuronide*

3.4.4 *Listeria innocua*

Para a contagem de colónias de *Listeria innocua* foi utilizado *Palcam Agar Base* (PAB), um meio de cultura seletivo.

Para a preparação de PAB foram dissolvidas 68,9 g do meio de cultura desidratado em 1 L de água quente destilada, sendo depois autoclavado a 121 °C durante 15 minutos e, de seguida, colocado num banho a 60 °C. Foram depois adicionados 2 mL do suplemento seletivo e, por fim, o meio de cultura foi distribuído em placas de Petri (Oxoid, 2014).

A inoculação foi feita por espalhamento de 0,1 mL de amostra, em duplicado, sendo as respetivas placas incubadas a 37 °C durante 24 horas e os resultados expressos em ufc/g.

As colónias de *Listeria* em *Palcam* são pretas e têm um aspeto similar às da figura 27.



Figura 27 – *Listeria* em *Palcam Agar Base*
(adaptado de Biokar, s.d.)

3.4.5 *Salmonella Typhimurium*

Para a contagem de colónias de *Salmonella Typhimurium* foi utilizado *Xylose-Lisine-Desoxycholate Agar* (XLD), um meio de cultura seletivo.

Para a preparação de XLD foram dissolvidas 26,5 g do meio de cultura desidratado em 500 mL de água esterilizada, sendo depois fervido em placa de aquecimento a 250 a 300 °C e, de seguida, colocado num banho a 60 °C. Por fim, o meio de cultura foi distribuído em placas de Petri (Oxoid, 2014).

A inoculação foi feita por espalhamento de 0,1 mL de amostra, em duplicado, sendo as respetivas placas incubadas a 37 °C durante 24 horas e os resultados expressos em ufc/g.

As colónias de *Salmonella* em XLD são e similares às da figura 28.



Figura 28 – *Salmonella* em *Xylose-Lisine-Desoxycholate Agar* (adaptado de EoLabs, 2013)

3.4.6 *Staphylococcus aureus*

Para a contagem de colónias de *Staphylococcus aureus* foi utilizado *Baird-Parker Agar* (BP). Este é um meio seletivo e com capacidade de recuperar células danificadas.

O cloreto de lítio e o telurito actuam como agentes seletivos e a gema de ovo e o piruvato de sódio potenciam a recuperação de células danificadas (Adams e Moss, 2008).

Para a preparação de BP foram dissolvidas 58 g do meio de cultura desidratado em 950 mL de água destilada, sendo depois autoclavado a 121 °C durante 15 minutos e, de seguida, colocado num banho a 60 °C. Foi depois adicionado o suplemento seletivo (50 mL de gema de ovo com telurito) e, por fim, o meio de cultura foi distribuído em placas de Petri (Oxoid, 2014).

A inoculação foi feita por espalhamento de 0,1 mL de amostra, em duplicado, sendo as respetivas placas incubadas a 37 °C durante 24 horas, sendo obtidas colónias pretas similares às da figura 29, devido à redução do telurito (Adams e Moss, 2008).

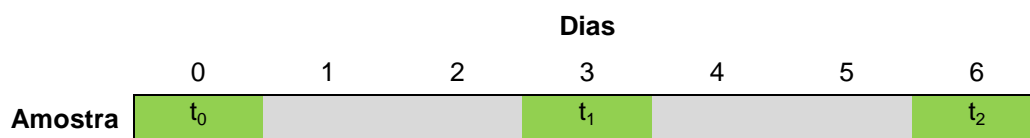
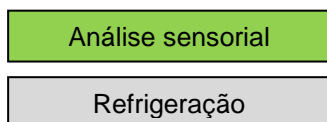


Figura 29 – *Staphylococcus aureus* em *Baird-Parker Agar* (adaptado de PVL, 2012)

Os resultados das contagens foram posteriormente expressos em ufc/g.

3.5 Avaliação sensorial

A qualidade sensorial do leitão foi avaliada segundo parâmetros visuais, seguindo a calendarização do Quadro 14.

Quadro 14 – Calendarização da avaliação sensorial**Legenda:**

Foram avaliadas características como a cor, exsudação de água e presença de fungos visíveis, que estão diretamente relacionadas com o sabor da carne e com a aceitação do produto pelo consumidor.

Sendo este um produto cárneo, de tempo de validade curto, não foram realizadas provas sensoriais de forma a avaliar o sabor, aroma e textura. Estas características são de qualidade máxima logo após à assadura, sofrendo deteriorações devido às reações de oxidação das gorduras e modificações na textura, podendo deixar de ser seguro para o painel de provadores.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação de mesófilos aeróbios totais ao longo do tempo

As amostras de leitão foram analisadas ao longo do tempo, de forma a acompanhar a evolução dos mesófilos. Os resultados estão apresentados no Anexo I e os três diferentes ensaios ilustrados na figura 30.

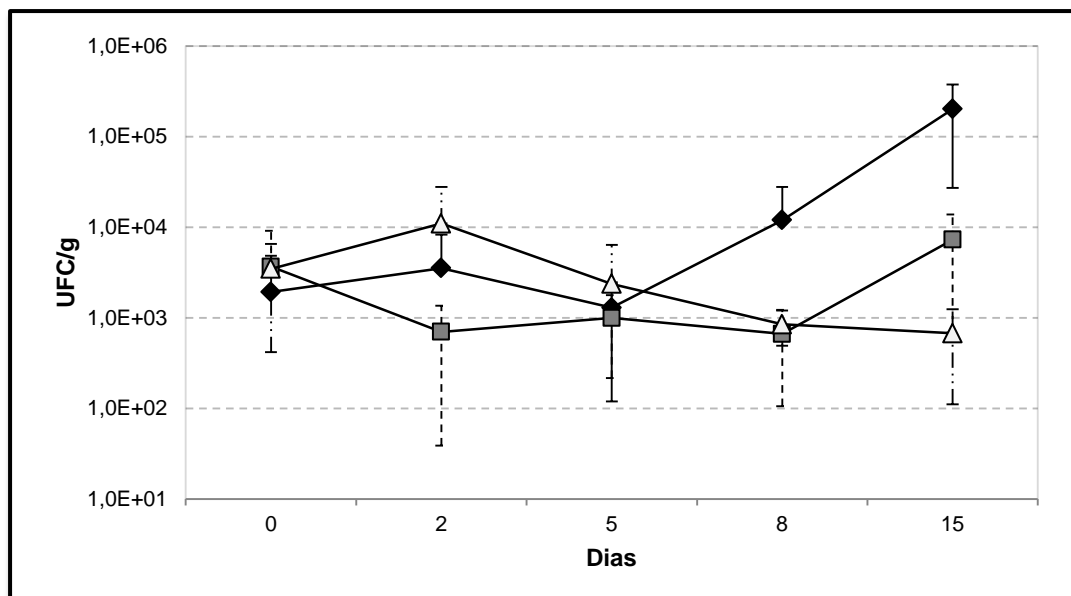


Figura 30 – Evolução das contagens de mesófilos totais durante o tempo de vida útil (◆ Cachaço; ■ Lombo; △ Perna)

Os valores do primeiro ensaio revelaram contagens microbianas menores do que 10^3 ufc/g. Ao analisarmos a figura 1 do anexo I, verificamos que, ao longo dos 15 dias, o desenvolvimento microbiano foi bastante estável, tendo sido a amostra correspondente à perna aquela que sofreu maiores oscilações no crescimento de mesófilos totais, quando comparada com as amostras relativas às outras partes da carcaça, isto é, cachaço e lombo.

Os valores do segundo e terceiro ensaios foram conseguidos através de amostras provenientes de diferentes leitões, mas do mesmo lote, revelaram contagens entre 10^1 e 10^5 ufc/g.

Recorrendo à figura 30, verificamos que o crescimento de mesófilos totais permaneceu relativamente estável até ao 5º dia de validade, tendo, no entanto, apresentado um crescimento exponencial de mesófilos aeróbios totais nas amostras correspondentes ao cachaço e ao lombo, nos dias seguintes.

Esta grande variabilidade nas contagens dos dois lotes diferentes foi evidenciada pelos elevados valores de desvio padrão, como ilustra a figura 30 e o anexo I.

Tal como foi referido na parte introdutória desta dissertação, os leitões usados para as amostras foram assados num forno tradicional a lenha. Este é um método que em muito dificulta o controlo de temperatura e a manutenção da uniformidade desta de lote para lote, sendo prova disso a variabilidade de contagens entre estes dois lotes, que pode dever-se a diferentes temperaturas na assadura e, assim, a diferentes temperaturas no centro térmico, não esquecendo que, sendo animais diferentes, as suas cargas microbianas iniciais são também consideravelmente diferentes.

O crescimento exponencial de mesófilos que ocorre especificamente no cachaço, ao fim de 5 dias, e no lombo, depois de 8 dias, pode também dever-se ao elevado contacto da carne com a pele do animal, mais suscetível a contaminações microbianas devido à sua microbiota natural e à elevada manipulação durante todo o processo. As amostras de perna, por terem uma maior percentagem de músculo, estão menos sujeitas a contaminações provocadas pela manipulação.

A questão que se coloca é a de saber o que fazer para evitar as contaminações durante a manipulação dos alimentos. Antes de mais, devem ser cumpridos os requisitos de higiene pessoal e de boas práticas de trabalho, bem como controlar a temperatura das câmaras frigoríficas e de congelação, evitar contaminações cruzadas, cumprir os procedimentos de limpeza dos equipamentos e superfícies e seguir os requisitos da legislação alimentar.

Como demonstra o Quadro 15, relativo às contagens microbianas no início e no fim do tempo de validade, nos 5 dias de *shelf-life* definidos anteriormente, a qualidade do produto é assegurada e a média de valores encontra-se dentro do limite máximo no que diz respeito à contagem de mesófilos totais, que, como indicado no Quadro 8 desta dissertação, é de 3×10^5 ufc/g.

Quadro 15 – Contagens microbianas no início e fim do tempo de validade

		Contagens microbianas em leitão (ufc/g)	
		t_0	t_5
Mesófilos totais	Cachaço	$1,93 \times 10^3$	$1,30 \times 10^3$
	Lombo	$3,67 \times 10^3$	$9,97 \times 10^2$
	Perna	$3,48 \times 10^3$	$2,37 \times 10^3$

Porém, após o período de validade de 5 dias, dá-se um crescimento exponencial da microbiota, o que revela o início da deterioração do alimento mas, ainda assim, sem ultrapassar, em momento algum, o limite máximo durante os 15 dias em que decorreu o ensaio.

Em suma, os resultados obtidos permitem demonstrar que o leitão, nas condições do ensaio, é um produto onde não se observa crescimento microbiano acima dos limites máximos ao fim dos 5 dias de vida útil considerados no HACCP da empresa.

4.2 Challenge test

Os resultados do *challenge test* estão apresentados no Anexo II e ilustrados na figura 31.

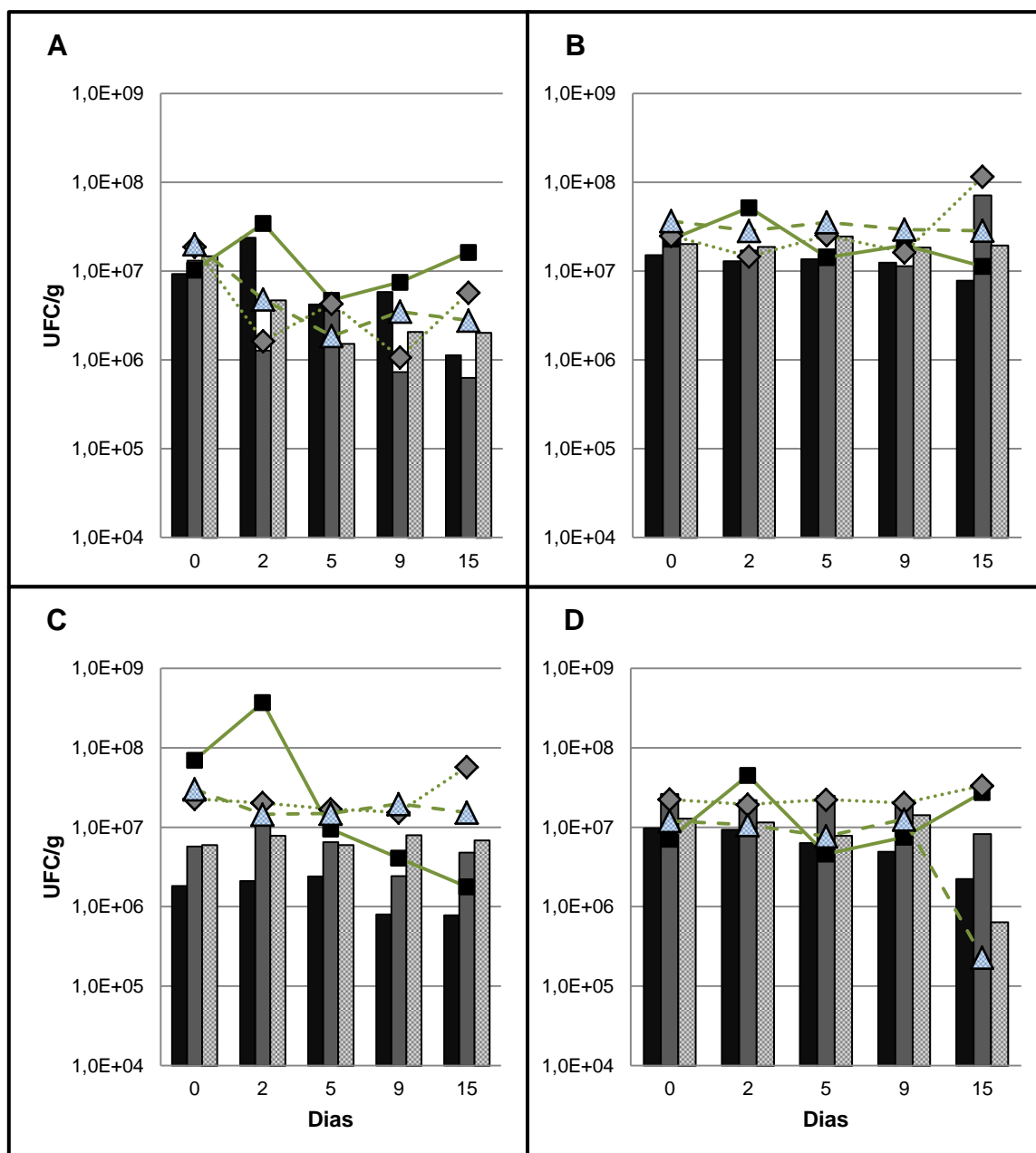


Figura 31 – Challenge test de *Escherichia coli* (A), *Listeria innocua* (B), *Salmonella Typhimurium* (C) e *Staphylococcus aureus* (D) após inoculação em leitão assado.
(■ Cachaço; ■ Lombo; ■ Perna)
(Mesófilos: —■ Cachaço;♦ Lombo; -▲ Perna)

No que diz respeito à inoculação com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, nos gráficos A e D, respectivamente, foi demonstrado que a biomassa tem tendência a decrescer ao longo do tempo.

A inoculação com *Listeria* e *Salmonella*, respectivamente representada nos gráficos B e C, demonstra que estas bactérias patogênicas mantêm-se relativamente estáveis ao longo do tempo.

Assim, é possível concluir que não existem tendências de crescimento dos quatro diferentes microrganismos. Isto revela que o leitão, conservado entre 8 e 10 °C, não promove o desenvolvimento dos microrganismos patogénicos analisados.

As diferenças entre as zonas da carcaça não resultaram numa discrepância significativa de resultados, o que apoia a discussão de resultados do ponto 4.1, que refere que as contaminações devem estar, em parte, relacionadas com o processamento.

Sendo os microrganismos inoculados os principais responsáveis por doenças de origem alimentar, o facto de não evoluírem de forma exponencial, nas condições de conservação testadas, demonstra que a armazenagem sob refrigeração durante o período de vida útil não aumenta o risco de aparecimento de patogéneos acima do limite legal. De facto, estes resultados demonstram que mesmo na hipótese de haver contaminações iniciais com patogéneos, sob temperaturas de refrigeração, estas não evoluirão de forma a ultrapassar os limites legais. Assumindo eventuais quebras na cadeia de frio ou durante o reaquecimento do alimento, que podem causar crescimentos exponenciais das bactérias presentes no alimento contaminado, é essencial aplicar boas práticas de higiene na manipulação dos leitões após assadura para reduzir ao máximo a contaminação microbiana inicial.

4.3 Avaliação sensorial

A avaliação sensorial do leitão foi realizada tendo por base a amostra da figura 32.

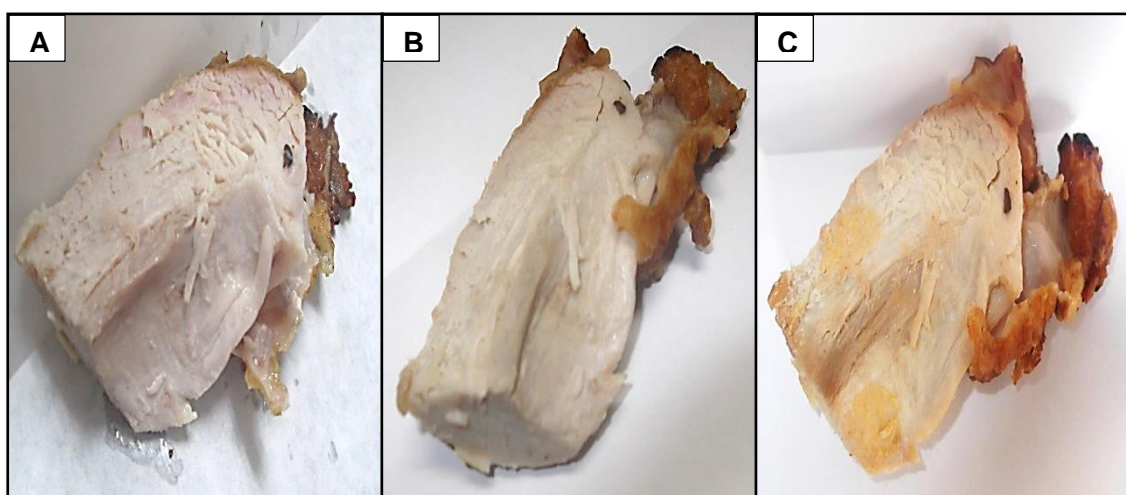


Figura 32 – Avaliação sensorial de uma amostra de leitão assado após a assadura (A), depois de 3 dias (B) e após 6 dias em refrigeração (C)

A carne de leitão, após a assadura, apresenta uma cor maioritariamente branca com tonalidades de rosa claro. A gordura é líquida, sendo facilmente exsudada, proporcionando à carne um aspeto brilhante. A pele é estaladiça e a textura da carne tenra, a par do sabor característico da carne de leitão, potenciada pelos aromas do forno aquecido a lenha.

Ao 3º dia de refrigeração a cor varia entre branco e cinzento. A exsudação de água e gordura é já praticamente nula, resultando numa carne seca e muito menos tenra. A pele é mole e elástica, sendo rejeitada pelos consumidores.

Ao 6º dia, no dia seguinte ao término do prazo de validade, a presença de bolor visível foi verificada, sendo este um fator muito importante, uma vez que os bolores são responsáveis por aromas indesejáveis nos alimentos, levando à total rejeição do produto por parte do consumidor.

Como qualquer outro produto com um curto tempo de validade, a carne inicia a sua deterioração logo após ao processamento. Ao fim de 6 dias a deterioração é bastante evidente. Sendo assim, de forma a conservar as características sensoriais, o leitão deve ser consumido, preferencialmente, no dia de assadura, podendo ser conservado por 2 a 3 dias.

5. CONCLUSÕES

5.1 Considerações finais e trabalhos futuros

Os ensaios realizados e os resultados apresentados permitem a obtenção de várias conclusões sobre a qualidade e segurança do leitão assado de Negrais.

No que diz respeito à determinação dos mesófilos aeróbios totais foi verificado que o seu desenvolvimento permaneceu estável até ao 5º dia de validade, tendo, nos dias seguintes, apresentado um crescimento exponencial nas amostras de cachaço e de lombo. Este crescimento pode dever-se ao elevado contacto da carne com a pele do animal, que é mais suscetível a contaminações microbianas, tal como explicado anteriormente; à elevada manipulação durante todo o processo e; ao processo natural de deterioração dos produtos alimentares.

Foi observada uma grande variabilidade nas contagens entre dois lotes diferentes. As causas prováveis para que tal se tenha verificado são a dificuldade em efetuar um controlo de temperatura eficaz num forno a lenha, a avaliação de diferentes animais que podem corresponder a diferentes microbiotas e a probabilidade de contaminação durante a manipulação.

Nos 5 dias de *shelf-life* pré-definidos, a qualidade do produto é assegurada e a média de valores encontrou-se, durante toda a duração do ensaio, dentro do limite máximo no que diz respeito à contagem de mesófilos totais.

No que diz respeito ao *challenge test*, foi possível concluir que não existem tendências de crescimento das quatro diferentes bactérias patogénicas, revelando que o leitão, conservado entre 8 e 10 °C, não promove o desenvolvimento dos microrganismos patogénicos analisados, sendo um produto seguro para consumo.

Ainda assim, é necessário ter em conta possíveis quebras na cadeia de frio ou crescimentos exponenciais durante o reaquecimento do alimento, que facilmente podem pôr em risco a saúde do consumidor.

Apesar de o alimento ser microbiologicamente seguro, isso não significa que a qualidade sensorial seja mantida exatamente durante o mesmo período.

Foi assim possível verificar que ao 3º dia de refrigeração a cor da carne apresenta tonalidades cinzentas, a textura é seca e a pele elástica e mole e ao 6º dia, a presença de bolor visível foi verificada, o que leva à total rejeição do produto por parte do consumidor.

Sendo um produto com um curto tempo de validade, a carne inicia a sua deterioração logo após ao processamento. Sendo assim, de forma a ser seguro microbiologicamente e conservar as suas ótimas características sensoriais, o leitão

deve ser consumido, preferencialmente, no dia de assadura, podendo ser conservado por 2 a 3 dias a temperaturas de refrigeração.

Em suma, os resultados obtidos permitem assegurar que o leitão foi confeccionado nas melhores condições, sendo importante referir a importância de uma correta higiene pessoal dos manipuladores de alimentos e a eficaz higienização dos utensílios e equipamentos.

Este é um produto seguro e de qualidade principalmente quando consumido no dia da assadura e conservado a temperaturas de refrigeração durante 2 a 3 dias, tendo em conta tanto a segurança microbiológica como a qualidade sensorial.

Para garantir que o leitão continue a ser reconhecido como um produto tradicional de qualidade, merecedor da confiança dos consumidores, deve realizar-se uma avaliação detalhada e generalizada das condições a que este produto é submetido quer nos pontos de venda, quer durante as diferentes formas de conservação dentro do período de vida útil, como diferentes temperaturas de refrigeração, congelação e embalagem em atmosfera modificada.

Seria também importante implementar um rótulo com informação mais detalhada, como a data de assadura, o nome do fornecedor, região da qual o produto é originário e tempo de validade, de forma a informar o consumidor.

A venda a nível nacional e a exportação deste produto é possível, sob condições que carecem ainda de estudo científico. A realização de tais seria essencial para a divulgação deste produto de excelente qualidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.1 Bibliografia

ADAMS, M.; MOSS M. – Food Microbiology. 3ª ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2008. 463 p.

BAIRD-PARKER, T. – The Production of Microbiologically Safe and Stable Foods. In: LUND, B.; BAIRD-PARKER, T.; GOULD, G. – The Microbiological Safety and Quality of Foods. 1ª ed. Maryland: Aspen Publishers, 2000. Cap. 1, 3-18 p.

BARBERIS, C. – Les micromarchés alimentaires: produits typiques de qualité dans la régions méditerranéennes. 1ª ed. Luxembourg: Commission des Communautés européennes, 1992. 41 p.

BECKER, T. – Defining meat quality. In: KERRY, J.; LEDWARD, D. – Meat Processing – Improving quality. 1ª ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2002. Cap. 2, 3-24 p.

BERNAT, E. Los “nuevos consumidores” o las nuevas relaciones entre campo y ciudad a través de los “productos de la tierra”. Agricultura y Sociedad, nº 80-81, 1996, 83-116 p.

BORCH, E; ARINDER, P. Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products as well as control measures. Meat Science, nº 62, 2002, 381-390 p.

BRIDI, A. M.; SILVA, C. A. – Qualidade da Carne Suína e Factores que Influenciam. Londrina: Universidade Estadual da Londrina – Grupo de pesquisa e análise de carne, 2012, 17 p. Trabalho de produção científica.

BROWN, M. – Processed Meat Products. In: LUND, B.; BAIRD-PARKER, T.; GOULD, G. – The Microbiological Safety and Quality of Foods. 1ª ed. Maryland: Aspen Publishers, 2000. Cap. 18, 389-419 p.

D'AOUST, J. – Salmonella. In: LUND, B.; BAIRD-PARKER, T.; GOULD, G. – The Microbiological Safety and Quality of Foods. 1ª ed. Maryland: Aspen Publishers, 2000. Cap. 45, 1233-1299 p.

DESPACHO nº 25034/2009. Diário da República 2ª Série. 222 (16-11-09)

FARBER, J.; PETERKIN, P. – Listeria monocytogenes. In: LUND, B.; BAIRD-PARKER, T.; GOULD, G. – The Microbiological Safety and Quality of Foods. 1ª ed. Maryland: Aspen Publishers, 2000. Cap. 44, 1178-1232 p.

FIB. Shelf Life – Uma Pequena Introdução. Food Ingredients Brasil, nº 18, 2011, 67-73 p.

FLORÊNCIO, L.; MARTA, L. – Projecto Controlo da Qualidade de Leitão Assado de Negrais, Comercializado em Grandes Superfícies. Lisboa: Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica - Escola de Tecnologia e Gestão Industrial, 2005. 88 p. Trabalho de final de curso em especialização em Qualidade Alimentar.

FREIRE, J. – Produção de suínos. [Projeção visual], [2012]. 51 diapositivos. Apresentação efetuada no âmbito da disciplina de Sistemas de Produção de Carne e Leite. Acessível no Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal.

GIL, J. I. – Manual de Inspeção Sanitária de Carnes. 3ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000. 660 p.

HERBERT, R.; SUTHERLAND, J. – Chill Storage. In: LUND, B.; BAIRD-PARKER, T.; GOULD, G. – The Microbiological Safety and Quality of Foods. 1ª ed. Maryland: Aspen Publishers, 2000. Cap. 5, 101-121 p.

HIGGS, J. – The nutritional quality of meat. In: KERRY, J.; LEDWARD, D. – Meat Processing – Improving quality. 1ª ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2002. Cap.4, 64-104 p.

IFST – Shelf life of Foods – Guidelines for its determination and prediction. 1ª ed. London: Institute of Food Science & Technology (UK), 1993. 78 p.

ISO 6579:2002, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Switzerland: International Organization for Standardization, 34 p.

ISO 11290-1:1996, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Switzerland: International Organization for Standardization, 15 p.

ISO 16649-2:2001, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Switzerland: International Organization for Standardization, 15 p.

KILCAST, D.; SUBRAMANIAM, P. – Introduction. In: KILCAST, D.; SUBRAMANIAM, P. – The stability and shelf-life of food. 1ª ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2000. Cap. 1, 1-22 p.

LEDWARD, D. – Introduction. In: KERRY, J.; KERRY, J.; LEDWARD, D. – Meat Processing – Improving quality. 1ª ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2002. Cap.1, 1-2 p.

LUND, B. – Freezing. In: LUND, B.; BAIRD-PARKER, T.; GOULD, G. – The Microbiological Safety and Quality of Foods. 1ª ed. Maryland: Aspen Publishers, 2000. Cap. 6, 122-145 p.

McCLURE, P. J. – Microbiological Hazard identification in the meat industry. In: KERRY, J.; KERRY, J.; LEDWARD, D. – Meat Processing – Improving quality. 1ª ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2002. Cap.11, 217-236 p.

MAGANHINI, M.; MARIANO, B.; SOARES, A.; GUARNIERI, P.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E. Carnes PSE (Pale, Soft, Exudative) e DFD (Dark, Firm, Dry) em lombo suíno numa linha de abate industrial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 27: 69-72.

MATOS, T. J. – Tecnologia da Carne e do Pescado. Lisboa: Universidade de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia, 2013, 125 p. Manual da disciplina de Tecnologia da Carne e do Pescado.

MILLER, R. K. – Factors affecting the quality of raw meat. In: KERRY, J.; KERRY, J.; LEDWARD, D. – Meat Processing – Improving quality. 1ª ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2002. Cap. 3, 27-63 p.

NP 1828:1982, Microbiologia Alimentar – Colheita e envio de amostras para análise microbiológica dos géneros alimentícios. Lisboa: Instituto Português da Qualidade, 7 p.

NP 1829:1982, Microbiologia Alimentar – Preparação da amostra para análise microbiológica. Lisboa: Instituto Português da Qualidade, 3 p.

NP 3005:1985, Microbiologia Alimentar – Preparação de diluições para análise microbiológica. Lisboa: Instituto Português da Qualidade, 6 p.

NP 3788:1990, Microbiologia Alimentar – Contagem de coliformes a 30 °C. Lisboa: Instituto Português da Qualidade, 6 p.

NP 4129:1994, Microbiologia Alimentar – Regras gerais para a elaboração de critérios de apreciação dos resultados de análises microbiológicas. Lisboa: Instituto Português da Qualidade, 6 p.

NP 4400-1:2002, Microbiologia Alimentar – Regras gerais para contagem de *Estafilococos* coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies). Lisboa: Instituto Português da Qualidade, 13 p.

NP 4405:2002, Microbiologia Alimentar – Regras gerais para a contagem de microrganismos a 30 °C. Lisboa: Instituto Português da Qualidade, 9 p.

PAMPULHA, M.; OLIVEIRA, A. – Engenharias e Arquitectura Paisagista – 2º Módulo – Microbiologia. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, 2009. Manual da disciplina de Microbiologia.

PEREIRA, M. – Estudo do prazo de validade em carne fresca de coelho. Lisboa: Universidade de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia, 2008, 57 p. Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar – Tecnologia dos Produtos Animais.

PFLUG, I.; GOULD, G. – Heat Treatment. In: LUND, B.; BAIRD-PARKER, T.; GOULD, G. – The Microbiological Safety and Quality of Foods. 1ª ed. Maryland: Aspen Publishers, 2000. Cap. 3, 36-63 p.

REGULAMENTO (CE) nº 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano. Jornal Oficial da União Europeia.

REGULAMENTO (CE) nº 1441/2007 da Comissão que altera o Regulamento (CE) nº 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia.

RIBEIRO, M.; MARTINS, C. La certificación como estratégia de valorización de produtos agroalimentarios tradicionales: la alheira, um embutido tradicional de Trás-os-Montes. Agricultura y Sociedad, 1996, nº 80-81, 314-334 p.

RIBEIRO, R. Conservação dos alimentos, a cadeia de frio. Aves e ovos. 1997, Março/Abril, nº130, 27-35 p.

SAHIDI, F. – Lipid-derived flavors in meat products. In: KERRY, J.; KERRY, J.; LEDWARD, D. – Meat Processing – Improving quality. 1ª ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2002. Cap.5, 105-121 p.

TIBÉRIO, M.L. – Produtos Tradicionais: Importância Socio-económica na Defesa do Mundo Rural. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 1998. Comunicação nas 1^{as} Jornadas de Queijos e Enchidos – Produtos Tradicionais.

WILLSHAW, G.; CHEASTY, T.; SMITH, H. – Escherichia coli. In: LUND, B.; BAIRD-PARKER, T.; GOULD, G. – The Microbiological Safety and Quality of Foods. 1ª ed. Maryland: Aspen Publishers, 2000. Cap. 43, 1036-1117 p.

6.2 Cibergrafia

ANCSUB (2007). *A Raça Bísara*. Disponível em: <http://www.porcobisaro.net/dados/racabisara.php>. Acesso em: 29/03/2014.

Biokar (s.d.). *PALCAM agar*. Disponível em: http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/SW_PROD/863B1D19756C7C46C12574C700331E38?opendocument&LG=EN&. Acesso em 10/10/2014.

Embrapa (s.d.). *Noções de Ciência da Carne*. Disponível em: <http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc77/03nocoescarne.html#3.1.2>. Acesso em: 10/09/2014.

EoLabs (2013). *XLD Medium (USP) – PP0321*. Disponível em: <http://www.eolabs.com/xld-medium-usp.html>. Acesso em 10/10/2014.

HIMEDIA (2011). *Plate Count Agar (Standard Methods Agar)*. Disponível em: <http://himedialabs.com/TD/M091.pdf>. Acesso em: 1/10/2014.

INSA (2010). *Tabela da Composição de Alimentos*. Disponível em: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/Paginas/TabelaAlimentos.aspx>. Acesso em: 1/07/2014.

Magnoni, D.; Pimentel, I. (2005). *A importância da carne suína na nutrição humana*. Disponível em: www.abcs.org.br/attachments/099_4.pdf. Acesso em: 16/05/2014.

MERCK (2014). *Ringer tablets*. Disponível em: http://www.merckmillipore.com/PT/en/product/RINGER-tablets,MDA_CHEM-115525#anchor_TI. Acesso em: 1/10/2014.

Oxoid (2014). *Baird-Parker Agar Base*. Disponível em: http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0275&org=153&c=uk. Acesso em: 2/10/2014.

Oxoid (2014). *Palcam Agar Base*. Disponível em: http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0877&org=91&c=uk&lang=EN. Acesso em: 2/10/2014.

Oxoid (2014). *Tryptone Bile X-Glucuronide Medium (TBX)*. Disponível em: http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0945&org=71&c=uk&lang=en. Acesso em: 2/10/2014.

Oxoid (2014). *Tryptone Soya Broth (Casein soya bean digest medium)*. Disponível em: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0129. Acesso em: 2/10/2014.

Oxoid (2014). *X.L.D Agar*. Disponível em: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0469&org=128&c=UK&lang=EN. Acesso em: 2/10/2014.

PVL (2012). *Baird Parker Agar Base BK055*. Disponível em: http://www.pvl.pt/pt/produto/38_46+184/baird-parker-agar-base-bk055/. Acesso em: 10/10/2014.

Sarcinelli, M.; Venturini, K.; Silva, L. 2007. Características da Carne Suína. *Boletim técnico*. PIE-UFES:00907. Disponível em: http://www.agais.com/telomc/b00907_caracteristicas_carnesuina.pdf. Acesso em: 22/08/2014.

ANEXOS

Anexo I – Determinação de mesófilos aeróbios totais ao longo do tempo

Quadro 1 – Resultados do 1º Ensaio

1º Ensaio				
Dias		Cachaço (ufc/g)	Lombo (ufc/g)	Perna (ufc/g)
28-mai	0	$1,1 \times 10^2$	$4,6 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$
30-mai	2	$4,3 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	$3,0 \times 10^1$
02-jun	5	$2,3 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^1$
05-jun	8	$1,9 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	$4,4 \times 10^2$
12-jun	15	$7,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$7,0 \times 10^1$

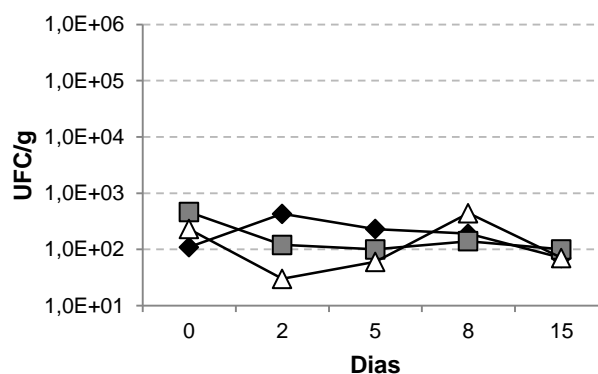


Figura 1 – Resultados do 1º Ensaio
(◆ Cachaço; ■ Lombo; △ Perna)

Quadro 2 – Resultados do 2º Ensaio

2º Ensaio				
Dias		Cachaço (ufc/g)	Lombo (ufc/g)	Perna (ufc/g)
25-jun	0	$5,3 \times 10^3$	$5,6 \times 10^2$	$3,9 \times 10^3$
27-jun	2	$9,0 \times 10^3$	$5,6 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$
30-jun	5	$1,1 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$6,0 \times 10^1$
03-jul	8	$3,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
10-jul	15	$3,1 \times 10^5$	$8,7 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$

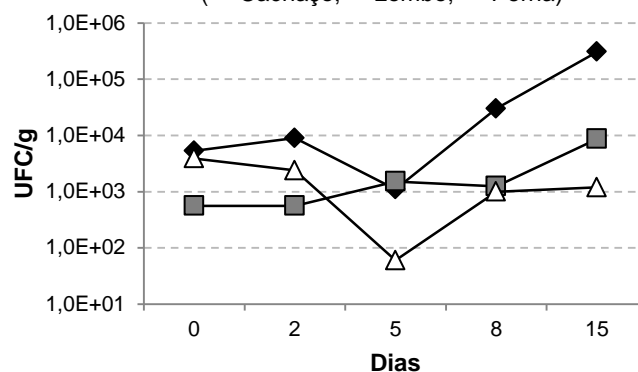


Figura 2 – Resultados do 2º Ensaio
(◆ Cachaço; ■ Lombo; △ Perna)

Quadro 3 – Resultados do 3º Ensaio

3º Ensaio				
Dias		Cachaço (ufc/g)	Lombo (ufc/g)	Perna (ufc/g)
25-jun	0	$3,7 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$	$6,3 \times 10^3$
27-jun	2	$1,2 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	$3,1 \times 10^4$
30-jun	5	$2,6 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	$7,0 \times 10^3$
03-jul	8	$5,8 \times 10^3$	$6,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$
10-jul	15	$3,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$	$7,7 \times 10^2$

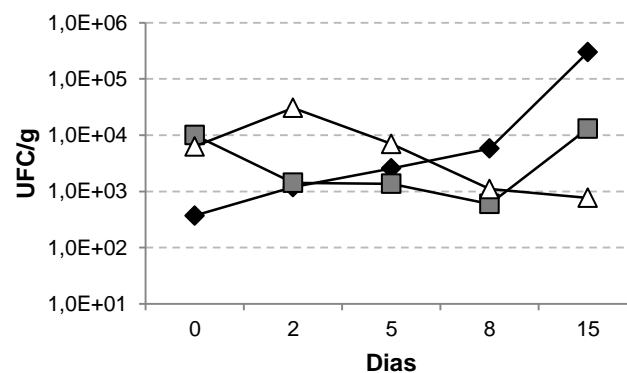


Figura 3 – Resultados do 3º Ensaio
(◆ Cachaço; ■ Lombo; △ Perna)

Quadro 4 – Média dos resultados dos ensaios

Determinação de mesófilos aeróbios totais ao longo do tempo						
Dias	Cachaço (ufc/g)		Lombo (ufc/g)		Perna (ufc/g)	
	Média	σ	Média	σ	Média	σ
0	$1,93 \times 10^3$	$2,92 \times 10^3$	$3,67 \times 10^3$	$5,48 \times 10^3$	$3,48 \times 10^3$	$3,06 \times 10^3$
2	$3,54 \times 10^3$	$4,74 \times 10^3$	$7,00 \times 10^2$	$6,61 \times 10^2$	$1,10 \times 10^4$	$1,70 \times 10^4$
5	$1,30 \times 10^3$	$1,18 \times 10^3$	$9,97 \times 10^2$	$7,80 \times 10^2$	$2,37 \times 10^3$	$4,01 \times 10^3$
8	$1,20 \times 10^4$	$1,58 \times 10^4$	$6,63 \times 10^2$	$5,58 \times 10^2$	$8,47 \times 10^2$	$3,56 \times 10^2$
15	$2,02 \times 10^5$	$1,75 \times 10^5$	$7,30 \times 10^3$	$6,61 \times 10^3$	$6,77 \times 10^2$	$5,66 \times 10^2$

Anexo II – Challenge test

Quadro 1 – Challenge test em cachaço de leitão

Cachaço									
Dias		<i>Escherichia coli</i> (ufc/g)		<i>Listeria innocua</i> (ufc/g)		<i>Salmonella</i> Typhimurium (ufc/g)		<i>Staphylococcus aureus</i> (ufc/g)	
		TBX	PCA	Palcam	PCA	XLD	PCA	BP	PCA
23-jul	0	9,3x10 ⁶	1,0x10 ⁷	1,5x10 ⁷	2,3x10 ⁷	1,8x10 ⁶	7,0x10 ⁷	9,7x10 ⁶	7,1x10 ⁶
25-jul	2	2,4x10 ⁷	3,4x10 ⁷	1,3x10 ⁷	5,2x10 ⁷	2,1x10 ⁶	3,7x10 ⁸	9,3x10 ⁶	4,5x10 ⁷
28-jul	5	4,2x10 ⁶	4,7x10 ⁶	1,4x10 ⁷	1,4x10 ⁷	2,4x10 ⁶	9,5x10 ⁶	6,3x10 ⁶	4,6x10 ⁶
31-jul	8	5,8x10 ⁶	7,5x10 ⁶	1,2x10 ⁷	2,0x10 ⁷	8,0x10 ⁵	4,1x10 ⁶	4,9x10 ⁶	7,5x10 ⁶
07-ago	15	1,1x10 ⁶	1,6x10 ⁷	7,8x10 ⁶	1,1x10 ⁷	7,8x10 ⁵	1,8x10 ⁶	2,2x10 ⁶	2,7x10 ⁷

Quadro 2 – Challenge test em lombo de leitão

Lombo									
Dias		<i>Escherichia coli</i> (ufc/g)		<i>Listeria innocua</i> (ufc/g)		<i>Salmonella</i> Typhimurium (ufc/g)		<i>Staphylococcus aureus</i> (ufc/g)	
		TBX	PCA	Palcam	PCA	XLD	PCA	BP	PCA
06-ago	0	1,3x10 ⁷	1,9x10 ⁷	2,5x10 ⁷	2,5x10 ⁷	5,7x10 ⁶	2,3x10 ⁷	2,6x10 ⁷	2,2x10 ⁷
08-ago	2	1,3x10 ⁶	1,6x10 ⁶	1,7x10 ⁷	1,5x10 ⁷	1,1x10 ⁷	2,0x10 ⁷	2,2x10 ⁷	1,9x10 ⁷
11-ago	5	3,6x10 ⁶	4,3x10 ⁶	1,8x10 ⁷	2,5x10 ⁷	6,5x10 ⁶	1,7x10 ⁷	2,5x10 ⁷	2,2x10 ⁷
14-ago	8	7,3x10 ⁵	1,1x10 ⁶	1,1x10 ⁷	1,6x10 ⁷	2,4x10 ⁶	1,5x10 ⁷	2,1x10 ⁷	2,0x10 ⁷
21-ago	15	6,3x10 ⁵	5,7x10 ⁶	7,1x10 ⁷	1,2x10 ⁸	4,8x10 ⁶	5,8x10 ⁷	8,2x10 ⁶	3,3x10 ⁷

Quadro 3 – Challenge test em perna de leitão

Lombo									
Dias		<i>Escherichia coli</i> (ufc/g)		<i>Listeria innocua</i> (ufc/g)		<i>Salmonella</i> Typhimurium (ufc/g)		<i>Staphylococcus aureus</i> (ufc/g)	
		TBX	PCA	Palcam	PCA	XLD	PCA	BP	PCA
20-ago	0	1,5x10 ⁷	2,0x10 ⁷	2,0x10 ⁷	3,6x10 ⁷	6,0x10 ⁶	3,0x10 ⁷	1,3x10 ⁷	1,2x10 ⁷
22-ago	2	4,7x10 ⁶	4,8x10 ⁶	1,9x10 ⁷	2,8x10 ⁷	7,9x10 ⁶	1,5x10 ⁷	1,2x10 ⁷	1,1x10 ⁷
25-ago	5	1,5x10 ⁶	1,9x10 ⁶	2,5x10 ⁷	3,5x10 ⁷	6,0x10 ⁶	1,5x10 ⁷	7,9x10 ⁶	7,7x10 ⁶
28-ago	8	2,1x10 ⁶	3,5x10 ⁶	1,9x10 ⁷	2,9x10 ⁷	8,0x10 ⁶	2,0x10 ⁷	1,4x10 ⁷	1,3x10 ⁷
04-set	15	2,0x10 ⁶	2,8x10 ⁶	2,0x10 ⁷	2,8x10 ⁸	6,9x10 ⁶	1,5x10 ⁷	6,4x10 ⁵	2,3x10 ⁵